Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. h. c. H. Remmer

Isolierung von Enterozyten aus Meerschweinchen und Mensch. Die Eignung dieser Zellen für Untersuchungen zum Transport und Metabolismus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Esmail Ebrahim Mohamed Hegazy
aus Belbis / Ägypten

1983

UNIV
LISCHEN

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. h. c. H. Remmer

Isolierung von Enterozyten aus Meerschweinchen und Mensch. Die Eignung dieser Zellen für Untersuchungen zum Transport und Metabolismus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Esmail Ebrahim Mohamed Hegazy
aus Belbis / Ägypten

1983

Gedruckt mit Unterstützung
des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD).

Dekan:	Professor Dr. med. G. Fichtner
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med., Dr. med. h. c. H. Remmer
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. H. Malchow

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Meiner Frau
in Dankbarkeit

Teile der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht:

- Hegazy, E., Lopez del Pino, V., Schwenk, M. :
  Isolated intestinal mucosa cells of high viability from guinea pig.
  Eur. J. Cell Biol. 3o, 132-136 (1983)

- Hegazy, E., Schwenk, M. : Riboflavin uptake by isolated enterocytes of guinea pig.
  J. Nutrition 1/3, 17o2-17o7 (1983)

- Schwenk, M., Hegazy, E., Lopez del Pino, V. :
  Kinetics of taurocholate uptake by isolated ileal cells of guinea pig.
  Eur. J. Biochem. 131, 387-391 (1983)

- Schwenk, M., Lopez del Pino, V., Hegazy, E. :
  Bile acid uptake by isolated intestinal mucosa cells of guinea pig.
  Biochem. Biophys. Acta, 721, 247-252 (1982)

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 1979 bis April 1983 am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Remmer durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Remmer danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die immer gern gewährte Unterstützung und Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. M. Schwenk möchte ich für die Überlassung des Themas, für seine unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion und für die Übermittlung spezieller Methoden der dynamischen Biochemie danken.

Frau B. Frank gilt mein Dank für ihre Hilfe bei der technischen Durchführung der Experimente.

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	Material	9
2.2.	Lösungen	9
2.3.	Versuchstiere	10
2.4.	Menschliches Material	10
2.5.	Isolierung von Darmzellen	11
2.5.1.	Die Darmzellen aus Meerschweinchen	11
2.5.2.	Darmzellen aus menschlichem Darmmaterial	12
2.6.	Methoden zur Prüfung der Zellvitalität	12
2.6.1.	Trypanblaufärbung	13
2.6.2.	LDH-Freisetzung	13
2.6.3.	Bestimmung des intrazellulären wäßrigen Volumens	14
2.6.4.	K^+-Aufnahme	14
2.6.5.	Phenylalanin- und Uridin-Einbau	15
2.6.6.	Messung des zellulären Sauerstoffverbrauches	15
2.6.7.	Präparation für die Elektronenmikroskopie	16
2.7.	Proteinbestimmung	17
2.8.	Bestimmung des Transports	17
2.9.	Bestimmung der Konjugation	18
3.	ERGEBNISSE	19
3.1.	Vitalität isolierter Darmzellen	19
3.1.1.	Darmzellen aus Meerschweinchen	19
3.1.2.	Darmzellen vom Menschen	29
3.2.	Transport verschiedener Substanzen in Meerschweinchen-Darmzellen	31
3.2.1.	Gallensäuren	31

3.2.1.1. Lokalisation der Aufnahme im Darm 31
3.2.1.2. Na^+-Abhängigkeit der Aufnahme 33
3.2.1.3. Zeitlicher Verlauf 35
3.2.1.4. Sättigbarkeit 35
3.2.1.5. Einfluß von metabolischen Hemmern 37
3.2.1.6. Kompetitive Hemmung 39
3.2.1.7. Einfluß der Temperatur 45
3.2.1.8. Einfluß des pH 47
3.2.2. Cholin 49
3.2.2.1. Lokalisation der Aufnahme im Darm und zeitlicher Verlauf 49
3.2.2.2. Wirkung von Ouabain auf die Aufnahme 51
3.2.2.3. Energieabhängigkeit der Aufnahme 53
3.2.2.4. Sättigbarkeit 53
3.2.3. Riboflavin 55
3.2.3.1. Zeitlicher Verlauf und Lokalisation der Aufnahme im Darm 55
3.2.3.2. Na^+-Abhängigkeit der Aufnahme 57
3.2.3.3. Sättigbarkeit 59
3.2.3.4. Energieabhängigkeit der Aufnahme 61
3.2.3.5. Einfluß der Temperatur 63
3.3. Konjugation von Äthinylöstradiol in Meerschweinchen-Darmzellen 63

4. DISKUSSION 65

4.1. Isolierte Darmzellen als Modell für Transport und Metabolismus 65
4.2. Lokalisation und Mechanismen der Transportvorgänge 68
4.2.1. Gallensäuren 68
4.2.2. Cholin 71
4.2.3. Riboflavin 72

4.3. Bedeutung der Konjugation von Äthinyl-östradiol im Darm 74

5. ZUSAMMENFASSUNG 75

6. LITERATURVERZEICHNIS 76

1. EINLEITUNG

Die Darmmukosa reguliert die Aufnahme von Nahrungsinhaltsstoffen. Dichte Kontakte zwischen den Zellen des einschichtigen Epithels verhindern die direkte und unkontrollierte Resorption von Stoffen aus dem Darmlumen. Nur die biologisch wichtigen Moleküle erhalten über hochspezifische Transportsysteme der Bürstensaummembran Zutritt. Sie werden in die Enterozyten aufgenommen und transzellulär transportiert (1,2,3). Aber die Darmmukosa spielt auch im Intermediärmetabolismus eine wichtige Rolle wie Untersuchungen am Ganztier (4), am isoliert perfundierten Darm (5-11) und mit Darmsäcken (3) gezeigt haben.
Obgleich die grundliegenden Funktionen der Darmmukosa heute klar sind, ist unser Wissen über viele Detailfragen noch sehr begrenzt. So sind zum Beispiel die Mechanismen der meisten Transportsysteme unbekannt und die Bedeutung des Darmes beim Fremdstoffmetabolismus ist unklar. Die traditionellen Untersuchungsmethoden können uns bei der Lösung dieser Fragen nur wenig helfen. Deshalb wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen drei neue Präparationsverfahren entwickelt, die zur Zeit ständig verbessert werden. Es handelt sich dabei um die Herstellung von Bürstensaum-Membranvesikeln, Organkulturen und isolierte Enterozyten.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Präparation und Verwendbarkeit isolierter Enterozyten. Sie hatte das Ziel, bekannte Isolierungsmethoden soweit zu verbessern, daß die Darmzellpräparationen in Ausbeute, Qualität und experimenteller Verwendbarkeit mit isolierten Leberzellen vergleichbar werden.
Isolierte Darmmukosazellen als Untersuchungspräparat und spezifische Funktionen der Darmmukosa zu testen, haben viele Vorteile gegenüber Versuchen am ganzen Organ (Darmschlinge, Darmsäcke und Darmringe). Diese Vorteile lassen

UNIV. LEIDEN BIBL.

sich folgendermaßen berschreiben (12):

1)Suspensionen isolierter Darmmukosazellen sind frei von Zellen aus Submukosa, Muskularis, oder Serosa.
2)Die Zellen können mit den Testsubstanzen homogen inkubiert werden; "ungerührte" Schichten spielen keine Rolle und die Sauerstoffversorgung der Zellen ist gewärleistet.
3)Die interazelluläre Konzentration einer Substanz kann genau bestimmt werden.
4)Reaktionskinetiken lassen sich bestimmen durch die Ermittlung der initialen Geschwindigkeiten.
5)Zahlreiche Versuche können mit den Zellen von einem Tier durchgeführt werden. Proben und Kontrollen von einem Tier lassen die biologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren Überwinden.
Isolierte Zellen haben gegenüber isolierten Memberanvesikeln den großen Vorteil, daß sie metabolisch intakt sind.

Diese Vorteile sind so groß, daß die Nachteile der isolierten Zellen,nämlich Verluste der polaren Ausrichtung im Gewebe, und kurze Lebensdauer der Zellen in Kauf genommen werden. Die Frage nach der Lokalisation von Transportprozessen (basal oder im Bürstensaum) kann mit isolirten Zellen nicht beantwortet werden.

Harrer und Mitarbeiter (13) waren im Jahre 1964 die ersten, die intakte Darmepithelzellen für in vitro Untersuchungen benutzt haben. Danach sind viele Methonden zur Isolierung von Darmmukosazellen entwickelt worden. Die zellen wurden abgelöst unter Behandlung des Darmes mit Enzymen (12,14, 15,16) Chelatbildnern (17,18,19) oder mechanischen Verfahren (20,21,22).

Alle diese Methoden haben prinzipiell das Ziel, die Verbindungen zwischen Darmmukosazellen zu lösen, und die Bindungen der Zellen an die Basalmembran aufzubrechen. Diese Verbindungen (23) sind in Abb. (1) schmatisch zusammengefaßt.

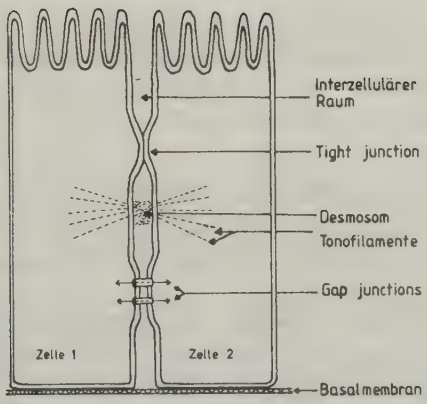


Abb. 1:

Verbindungen zwischen Darmmukosazellen

Tight junctions sind sehr dichte Verbindungen zwischen zwei benachbarten Zellen und schließen das Darmlumen vom Interzellulärraum ab. Sie bestehen aus Proteinen; für ihre Stabilität spielt Calzium eine große Rolle.
Gap junctions sind dünne Kanäle zwischen zwei benachbarten Zellen, die eine Verbindung zwischen dem Zytoplasma beider Zellen herstellen. Sie bestehen aus Proteinen (Tubulinschläuche?).
Desmosomen sind fibrilöse Verbindungen zwischen zwei benachbarten Zellen, die der mechanischen Stabilität der Mukosa dienen. Aktin ist am Aufbau beteiligt.

Die meisten Isolierungsmethoden für Darmzellen sind entweder sehr kompliziert und langwierig oder sie setzen die Zellen einer starken mechanischen Belastung aus, wodurch die Zellintegrität beeinträchtigt wird, so daß Rückschlüsse von Versuchen mit Zellen auf die in vivo Verhältnisse nicht unbedingt zulässig sind. Keine der bisher in der Literatur beschriebenen Isolierungsmethoden, lieferten Zellen, die in Qualität, Ausbeute und Handhabbarkeit mit isolierten Leberzellen vergleichbar waren. Sämtliche Versuche, Darmmukosazellen der Ratte schleimfrei und in homogener Suspension zu halten, schlugen bislang fehl.

In dieser Arbeit wird eine Methode zur Isolierung von Darmmukosazellen aus Meerschweinchen beschrieben, die die oben genannten Kriterien erfüllt, und diese Methode wird auch erfolgreich zur Isolierung von menschlichen Darmmukosazellen angewandt.
Diese neue Isolierungsmethode basiert auf einem Verfahren, das Weiser (24) zur Isolierung von Rattendarmzellen entwickelt hatte. Dieses Verfahren wurde nun beim Meerschweinchen angewandt, weil dessen Mukosa viel weniger Schleim bildet, als die der Ratte (25). Diese Methode wurde dann optimiert, um homogene Suspensionen von Darmzellen guter Qualität und in möglichst hoher Ausbeute zu erhalten.

Verschiedene Vitalitätstests wurden durchgeführt. Sie zeigten alle, daß die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der frisch isolierten Enterozyten intakt sind.

Damit waren die Voraussetzungen gegeben, um diese Zellen zur Untersuchung biochemisch-pharmakologisch interessanter Probleme einzusetzen.

Die Schwerpunkte dieses Teiles lagen bei den Fragen:
Sind die Zellen geeignet, um carriervermittelte Transportprozesse der Mukosazellen zu untersuchen und welche Mechanismen liegen diesen Transportvorgängen zugrunde?
Sind die Zellen geeignet zur Untersuchung des intestinalen Fremdstoffmetabolismus?.

Als Substrate für den Membrantransport wurden Gallensäuren, Cholin und Riboflavin verwendet. Als Substrat für die Fremdstoffkonjugation wurde Äthinylöstradiol eingesetzt. Im folgenden soll kurz die Auswahl dieser Substrate begründet werden:

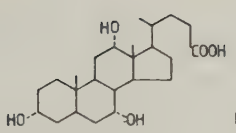
1) Der Gallensäuretransport wurde aus zwei Gründen unteruntersucht: Erstens besitzt der Dünndarm des Meerschweinchens ein hochaktives Transportsystem zur Reabsorption von Gallensäuren. Dieses im distalen Ileum lokalisierten Transportsystems ist noch nicht ausreichend untersucht worden und eine weitere Charakterisierung des Mechanismus erschien wünschenswert. Insbesondere war unklar, inwieweit Ähnlichkeiten zum hepatischen Taurocholatcarrier (26) bestehen. Zweitens wurden in den letzten Jahren Gallensäuren therapeutisch zur Auflösung von Cholesterinsteinen eingesetzt. Diese therapeutischen Gallensäuren (Chenodeoxycholsäure, Ursodeoxycholsäure) sind im Gegensatz zu den physiologischen Gallensäuren unkonjugiert und dadurch lipophiler. Es wurde geprüft, ob diese Gallensäuren ebenfalls über den Carrier im Ileum transportiert werden und welche Rolle die Diffusion bei ihrem Transport spielt.

2) Cholin, lange als Vitamin angesehen, wird heute als

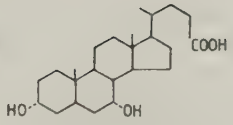
Leberschutzpräparat angepriesen (27). Die intestinale Resorption von Cholin ist in den letzten Jahren eingehend untersucht worden (28) und es besteht kein Zweifel, daß bei der Resorption ein Carrier beteiligt ist. Jedoch blieb die Frage umstritten, ob der Transport aktiv und Na^+-abhängig ist, oder ob er über vermittelte Diffusion läuft. Unter dieser Fragestellung wurde der Transport von Cholin an isolierten Zellen untersucht.

3) Riboflavin ist in vielen Vitaminpräparaten enthalten. Es wird nach neuen Untersuchungen in einem spezifischen Transportvorgang aus dem Darmlumen resorbiert. Die Lokalisation des Transportsystems und seine kinetischen Eigenschaften sind bisher nicht geklärt. Es war zu erwarten, daß die Versuche Auskunft zu der Frage geben, warum Riboflavinmangel nur sehr selten vorkommt.

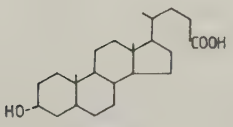
4) Äthinylöstradiol ist als synthetisches Östrogen in den meisten Kontrazeptiva enthalten. Seine hohe Wirksamkeit wird durch eine sterische Behinderung des oxydativen Abbaus erklärt (29). Es wird wie andere Östrogene in der Leber mit Sulfat und Glukuronsäure konjugiert (30). Oral eingenommenes Äthinylöstradiol wird, wie neuere Untersuchungen zeigen, schon bei der Resorption in der Darmmukosa konjugiert, es unterliegt also einem intestinalen first pass effect (31,32,33,34,35,36). Die Rolle der isolierten Darmmukosazellen bei der Konjugation von Äthinylöstradiol wurde untersucht.



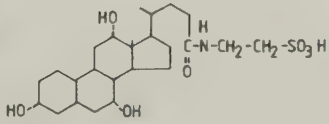
Cholsäure



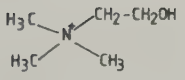
Chenodeoxycholsäure



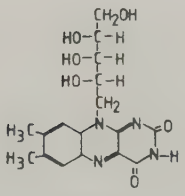
Lithocholsäure



Taurocholsäure



Cholin



Riboflavin

Ziel dieser Arbeit war, die Entwicklung einer neuen Methode für die Isolierung vitaler Darmmukosazellen. Die isolierten Darmmukosazellen wurden für Untersuchung des Transportes von Gallensäuren, Cholin und Riboflavin, sowie zur Charakterisierung der Konjugation von Äthinylöstradiol verwendet.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

(^{3}H(G)) Taurocholsäure (3,4 Ci/mMol), (2,4-^{3}H) Cholsäure (12 Ci/mMol), (11,12-^{3}H(N) Chenodeoxycholsäure (35 Ci/mMol), (^{3}H) Wasser (250 µCi/g), (Carboxyl-^{14}C) Dextran (1,3 Ci/g), (1,2-^{14}C) Cholinchlorid (66 mCi/mMol), (6-^{3}H) Uridin (20 Ci/mMol), L-(Alanin-2,3-^{3}H) Phenylalanin (18 Ci/mMol) und 17 (6,7-^{3}H)(N)-Äthinylöstradiol (55 Ci/mMol) wurden von New England Nuclear (Boston, USA) bezogen. (^{3}H(N)) Lithocholsäure (14 Ci/mMol) war ein Geschenk von Dr. A.F. Hofmann (San Diego, USA).

D-(2-^{14}C) Riboflavin (60,6 mCi/mMol) wurde von der Firma (Amersham, Braunschweig) bezogen.

Eagle's minimal essential medium war von der Firma Serva (Heidelberg, BRD).

Siliconöl AR 20 und AR 200 von der Firma Wacker Chemie (München, BRD).

Alle anderen Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad bei der Firma Sigma (St. Louis, USA) gekauft.

2.2. Lösungen

Lösung A pH 7,3	NaCl	96,0 mM
	KCl	1,5 mM
	$KH_2PO_4 \cdot H_2O$	5,6 mM
	Na_3-Citrat	27,0 mM
Lösung B pH 7,3	NaCl	140,0 mM
	Na_2HPO_4	16,0 mM
	EDTA	1,5 mM
	DTT	0,5 mM

Eagle's Minimum Essential Medium (MEM)

MEM-Pulver	9,6 g
NaCl	1,5 g

ad 950 ml aqua dest + 50 ml Hepes 225 mM
auf pH 7,3 einstellen.
Hepes = (N-2 Hydroxyethylpiperazine-Ni2-ethansulfonic acid) Sodium salt.

O_2-Medium (Hank's Medium) pH 7,3

NaCl	126,0 mM
$CaCl_2$	0,6 mM
KCl	5,2 mM
$MgSO_4$	0,8 mM
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	3,0 mM
Glukose	5,0 mM

2.3. Versuchstiere

Männliche Meerschweinchen (Pbw 500-700 g) wurden von der Firma Ivanovas (Kisslegg) bezogen. Die Meerschweinchen erhielten bis zum Versuchsbeginn Trockenfutter und Leitungswasser ad libitum. Sie wurden nicht vorbehandelt.

2.4. Menschliches Darmmaterial

Operationspräparate (aus der Sicherheitszone) vom distalen Ileum oder Colon wurden von der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen bereitgestellt.

2.5. Isolierung von Darmzellen

2.5.1. Die Darmzellen aus Meerschweinchen

Prinzip: Die Darmmukosazellen wurden nach einer selbst entwickelten Methode in Anlehnung an das Verfahren von Weiser (24) isoliert. Die Methode ist eine Kombination von chemischer und mechanischer Behandlung. Durch die chemische Behandlung werden die Zellverbände aufgelöst, indem das Kalzium durch Citrat und EDTA entzogen wird. Die Substanz Dithiotreitol dürfte Disulfidbrücken zwischen zwei Zellen spalten und bietet gleichzeitig einen Oxidationsschutz. Die mechanische Behandlung erfolgte durch Betasten des Darmes. Die Zellen lösen sich nach und nach von der Basalmembran.

Ausführung: Alle Lösungen, die zur Darmzellisolierung benötigt wurden (Lösung A und Lösung B) wurden auf 37° C erwärmt und mit Sauerstoff begast. Das Meerschweinchen wurde dekapitiert und ausgeblutet. Der Bauchraum wurde eröffnet und der Dünndarm wurde von Coecum bis zum Duodenum vorsichtig herauspräpariert und in vier gleich lange Teile geschnitten. Jeder Darmteil wurde mit 50 ml Lösung A durchspült und so vom Darminhalt und Schleim befreit. Dann wurden die Darmstücke mit Lösung A gefüllt und an beiden Enden mit Arterienklemmen verschlossen. Die mit Lösung A gefüllten Darmstücke wurden in einem Becherglas, das 100 ml Lösung A enthielt, untergetaucht und bei 37°C 10 Minuten lang unter Begasung inkubiert. Nach 10 Minuten wurde der Darminhalt verworfen, dann wurden die Darmstücke mit Lösung B gefüllt und 2 bis 3 Minuten lang in Lösung B (37°C, Sauerstoffbegasung) inkubiert. Dann wurden die Darmstücke herausgenommen und mit den Fingerspitzen an der Oberfläche leicht betastet. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß sich die Darmwände nicht berühren, da dies zu einer Schädigung der Zellen geführt hätte.
Der Inhalt der Darmstücke wurde in einer Vorlage von 100 ml

kaltem minimum essential medium (MEM) gesammelt. Die Behandlung mit Lösung B wurde 4 - 5 mal wiederholt und der Inhalt aller Fraktionen eines Segmentes wurde vereinigt. Die so gesammelten Fraktionen enthielten die abgelösten Zellen und wurden durch feinmaschige Seide (Maschenweite 0,25 mm) filtriert. Die Zellsuspensionen wurden bei 50 g 2 Minuten lang zentrifugiert, der Zellniederschlag wurde 2 mal in MEM gewaschen und dann in wenig MEM resuspendiert. Die Zelldichte wurde durch eine Hämatokritmethode schnell bestimmt. Und dann auf etwa 20 mg/ml Protein eingestellt. Diese Zellsuspensionen wurden bei 0°C bis zum Experiment aufbewahrt.

2.5.2. Darmzellen aus menschlichem Darmmaterial

Die Darmpräparate (Darmschlauch von 2 - 3 cm Länge) stammten aus den Sicherheitszonen bei Darmresektionen an Patienten mit Colon-Ca und Morbus Crohn. Die Präparate wurden unmittelbar nach der Entnahme in vorgewärmte (37°C) sauerstoffbegaste Lösung A eingebracht. Die Darmstücke wurden 2 bis 3 mal mit Lösung A durchspült bis sie sauber waren. Dann wurden die Darmschläuche mit Lösung A gefüllt und in der gleichen Weise weiterbehandelt wie beim Meerschwein, außer daß die Inkubationszeiten in Lösung A und in Lösung B länger waren (15 Minuten in Lösung A und je 5 Minuten in Lösung B).

2.6. Methoden zur Prüfung der Zellvitalität

Durch die Isolierungsprozedur könnte sich die Struktur und Funktion der Zellen verändern. Um solche Beschädigungen zu erfassen, wurde die Vitalität jeder Zellpräparation getestet. Eine Reihe verschiedener Vitalitätstests, wurden - entsprechend den Kriterien von Baur et al (37), - angewandt.

2.6.1. Trypanblaufärbung

5 µl Zellsuspension und 5 µl 0,2 %ige Trypanblaulösung wurden auf einer Zählkammer vorsichtig gemischt. Ein Deckglas wurde nicht aufgelegt, um die Zellen nicht zusätzlich zu schädigen. Die angefärbten und nicht angefärbten Zellen wurden im Lichtmikroskop ausgezählt und photografiert. Für die Experimente wurden nur solche Präparate verwendet, die im Mikroskop nicht mehr als 10 % Trypanblau gefärbte Zellen aufwiesen.

2.6.2. LDH-Freisetzung

LDH gehört zu den zytoplasmatischen Enzymen. Wenn die Permeabilität der Zellmembran erhöht ist oder die Zellmembran beschädigt ist, kann LDH aus der Zelle in das Medium freigesetzt werden.
Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand und in den Zellen, erfolgte in einem optischen Test (38), unter Zugabe von Pyruvat und NADH nach der folgenden Reaktion:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + NAD^+$$

Die LDH-Aktivität ergibt sich aus der NADH-Abnahme im Inkubationsansatz, die durch die Extinktion bei 366 nm ermittelt wird. Zur Bestimmung der LDH-Freisetzung wurden Zellen aus der Vorratssuspension in MEM bei 37°C unter Rühren inkubiert (1 - 2 mg Zellprotein/ml Inkubat). Nach bestimmten Zeiten (0,10,20,30,60 Minuten) wurden Proben von je 200 µl entnommen und in Eppendorfröhrchen pipettiert. Die Proben wurden sofort in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert (1 Minute). Der Überstand wurde dann vom Zellpellet getrennt. Auf das Zellpellet wurden 200 µl aqua dest und 5 µl 0,1 % Triton X 100 (Auflösen der Zellen) zugegeben und geschüttelt. Die LDH-Aktivität wurde in Über-

stand und Zellen ermittelt.

2.6.3. Bestimmung des intrazellulären wäßrigen Volumens

Um die intrazellulären Substratkonzentrationen genau zu bestimmen ist es notwendig die intrazellulären wäßrigen Volumina zu kennen. Die Messung erfolgt mit ^{3}H Wasser und ^{14}C-Dextran nach einer Methode die von Baur et al (37) beschrieben wurde: ^{3}H-Wasser wird homogen intra- und extrazellulär verteilt, ^{14}C-Dextran bleibt dagegen nur im extrazellulären Raum. Zur Durchführung wurden Darmzellen (2 mg Zellprotein/ml Inkubat) in MEM bei 37°C inkubiert unter Zugabe von 5 µl ^{3}H-Wasser (0,3 µCi + 5 µl ^{14}C-Dextranlösung (0,06 µCi). Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben von je 200 µl entnommen und die Zellen wurden durch Siliconfiltration vom Medium abgetrennt. Die Radioaktivität im Überstand und im Zellsediment wurden in einem Doppelkanal-Szintillationszähler bestimmt. Das intrazelluläre Volumen ergibt sich rechnerisch als Differenz zwischen ^{3}H-Wasserraum und ^{14}C-Dextranraum im Sediment.

2.6.4. K^{+}-Aufnahme

Die frisch isolierten Darmzellen wurden in MEM als dichte Suspension bei 0°C aufbewahrt. Die Zellen verlieren bei 0°C einen Teil ihres Kaliumgehaltes, da die Na^{+}-K^{+}-ATPase (Na^{+}-pumpe) bei dieser Temperatur nicht mehr aktiv ist (39). Wenn die Zellen dann bei 37°C wieder inkubiert werden, wird die Na^{+}-K^{+}-ATPase wieder aktiv und Kalium wird vom Medium in die Zellen aufgenommen. Voraussetzung für eine Kaliumakkumulation bei 37°C ist also eine noch intakte Na^{+}-K^{+}-ATPase und eine weitgehend K^{+}-dichte Zellmembran. Zur Bestimmung der Kaliumakkumulation wurden Zellen aus der Vorratssuspension in MEM bei 37°C unter Rühren inkubiert (1 - 2 mg Zellprotein/ml Inkubat). Nach 0, 2, 5, 10, 20 Minuten wurden jeweils 200 µl Zellsuspension entnommen

und in Beckmann-Röhrchen zentrifugiert, welche am Boden 50 µl TCA (3 M) und darübergeschichtet 100 µl Siliconöl (Dichte 1,02) enthielt. In diesem als Siliconöl-Filtrationsverfahren bezeichnenden Dichtezentrifugation (37, 40) wurden die Zellen vom Medium abgetrennt. Die Kaliumkonzentration im Sediment wurde flammenphotometrisch gemessen. Durch zusätzliche Bestimmung der intrazellulären und extrazellulären Volumina mit ^{3}H-Wasser und ^{14}C-Dextran konnte dann die intrazelluläre K^{+}-Konzentration berechnet werden.

2.6.5. Phenylalanin- und Uridin-Einbau.

Der Einbau von Phenylalanin in die Zellproteine und von Uridin in RNA, erfolgte nur in metabolisch intakten Zellen. Um die Einbaugeschwindigkeit zu ermitteln, wurden Darmzellen (2 mg Zellprotein/ml) in einem Hank's Medium bei 37°C unter Rühren 10 Minuten vorinkubiert. Durch Zugabe von 5 µl ^{3}H-Phenylalanin (0,5 µCi, 1 nMol) oder ^{3}H-Uridin (0,5 µCi, 1 nMol) wurde der Versuch gestartet. Nach bestimmten Zeiten (15 Sekunden, 10 Minuten, 20 Minuten, 40 Minuten, 60 Minuten) wurden Proben von je 200 µl entnommen und sofort in 5 ml eiskalte 3 M TCA gegeben und 15 Minuten stehengelassen. Die TCA-Lösung wurde durch Miliporfilter (0,4 µm) filtriert und die Aktivität der präzipitierten Makromoleküle auf den Membranfiltern wurde nach Trocknen und Zugabe von Bray-Szintillator in einem Szintillationszähler ermittelt.

2.6.6. Messung des zellulären Sauerstoffverbrauches

Dieser Test gibt Auskunft über den Zustand der Mitochondrien. Die Messung wird mit einer Clark-Elektrode (41) mit angeschlossenem Schreiber ausgeführt. Die Elektrode mißt direkt den Sauerstoffpartialdruck einer Flüssigkeit.

Zur Ermittlung des Sauerstoffverbrauches wurden 100 µl Zellsuspension (2 mg Protein) mit 700 µl MEM in der thermostatisierten Meßkammer unter Rühren und Luftabschluß (Schliffstopfen) inkubiert. Durch die Zellatmung nimmt der Sauerstoffgehalt der Suspension ab; die Geschwindigkeit der Abnahme ist direkt am Schreiber sichtbar. Die Grundatmung alleine ist als Vitalitätskriterium nicht ausreichend. Deswegen wurden nach Ermittlung der Grundatmung zusätzlich Atmung stimulierende und -hemmende Substanzen in folgender Reihenfolge zugegeben (jeweils 1 - 2 Minuten Abstand):

3 µl Oligomycin (10 mg/ml Äthanol)
3 µl FCCP (=Carbonyl-Cyanid-m-Chlorphenylhydrazon) 200 µM in Äthanol
3 µl Rotenon (0,8 mg/ml Äthanol)
3 µl Succinat (200 mM in Wasser).

2.6.7. Präparation für die Elektronenmikroskopie

Durch Zentrifugation (600 g, 5 Min.) wurden die Darmzellen vom Medium abgetrennt. Das Pellet wurde mit 2,5 %igem Glutaraldehyd (in 0,05 M Cacodylat-Puffer + 5 mM $CaCl_2$, pH 7,2) überschichtet und eine Stunde bei 37°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen in Cacodylat-Puffer wurde 1 Stunde in 1 %iger Osmiumtetroxydlösung (+ 0,8 % $K_3Fe(CN_6)$) in Cacodylat-Puffer fixiert. Die Entwässerung erfolgte in Lösungen ansteigender Acetonkonzentrationen. Das Pellet wurde in Spurr-Lösung über Nacht aufbewahrt und in Gelatine-Kapseln eingebettet. Die Anfärbung erfolgte mit Uranyl-Acetat und Bleicitrat. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Zeiss EM 10 im Institut für Pathologie der Universität Tübingen von Prof. Schlote gemacht.

2.7. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Zellproteins erfolgte nach einer modifizierten Biuret-Methode (42).

2.8. Bestimmung des Transports

Die Darmmukosazellen (2 mg Protein) wurden in 1,5 ml eines geeigneten Mediums (MEM oder Hank's-Medium) unter Rühren bei 37°C zunächst 15 Minuten lang vorinkubiert, damit der in der Kälte dissipierte transmembranöse Na^+-Gradient wieder aufgebaut werden konnte (39). Die Transportreaktion wurde gestartet von Zugabe von 10 µl einer Lösung, die das radioaktivmarkierte Substrat enthielt. Zu verschiedenen Zeiten wurden 200 µl der Suspension entnommen und in ein vorbereitetes Beckmann-Röhrchen pipettiert, das am Boden 50 µl KOH und darübergeschichtet 100 µl Siliconöl enthielt. Bei Zentrifugation in einer Beckmann-Mikrofuge wurden die Zellen innerhalb 1 - 2 Sekunden durch die Siliconöl-Schicht in die 3 M KOH geschleudert, wo sie denaturiert wurden. Damit wurde die Aufnahme gestoppt und die Zellen waren vom Medium abgetrennt. Durch Erwärmen der Röhrchen (1 Stunde, 85°C), wurden die Zellen aufgelöst. Die Zentrifugenröhrchen wurden in der Mitte der Siliconschicht durchschnitten und die Teile mit dem aufgelösten Sediment wurden in Szintillationsröhrchen überführt. Nach Zugabe von Bray-Szintillator wurde kräftig geschüttelt und die Radioaktivität in einem Packard-Szintillationszähler gemessen.
Bei der Durchwanderung der Siliconschicht reißen die Zellen etwas extrazelluläre Aktivität mit. Die mitgerissene Aktivität wurde mit ^{14}C-Dextran bestimmt und von der Radioaktivität im Sediment abgezogen, damit die intrazelluläre Substratkonzentration genau bestimmt werden konnte.

2.9. Bestimmung der Konjugation

Darmzellen (1 - 2 mg Protein/ml Inkubat) wurden in 1,5 ml MEM bei 37°C unter Rühren 15 Minuten lang vorinkubiert. Dann wurden 10 µl einer Lösung, die das radioaktivmarkierte Substrat Äthinylöstradiol in geeigneter Konzentration enthielt zugegeben. Nach bestimmten Zeiten (1, 10, 30 Minuten) wurden Proben von jeweils 200 µl aus dem Inkubationsansatz entnommen. Die Zellen wurden durch Siliconfiltration abgetrennt. Der Anteil der Konjugate im Medium und in den Zellen wurde durch Extraktion in Chloroform : Wasser (1 : 1) getrennt. Die Radioaktivität in den wasserlöslichen und Chloroform-löslichen Anteilen wurden im Packard-Szintillationszähler gemessen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vitalität isolierter Darmzellen

3.1.1. Darmzellen vom Meerschweinchen

Die Vitalität der isolierten Darmzellen wurde unmittelbar nach jeder Isolierung überprüft. Nur funktionell intakte Zellen wurden für weitere Messungen des Transports und der Konjugation verwendet.

Abbildung 2 A zeigt, daß etwa 6 % der frisch isolierten Zellen mit Trypanblau angefärbt wurden. Wenn die Zellen bei 37°C 60 Minuten lang unter Rühren in MEM inkubiert wurden, stieg der Anteil angefärbter Zellen nur bis auf 11 %. Trypanblau kann intakte Zellmembranen nicht oder nur sehr langsam passieren. Nur geschädigte Zellen werden mit Trypanblau angefärbt. Es wurde darauf geachtet, daß für weitere Versuche nur Zellpräparationen verwendet wurden, die zu Beginn weniger als 10 % blaue Zellen enthielten.

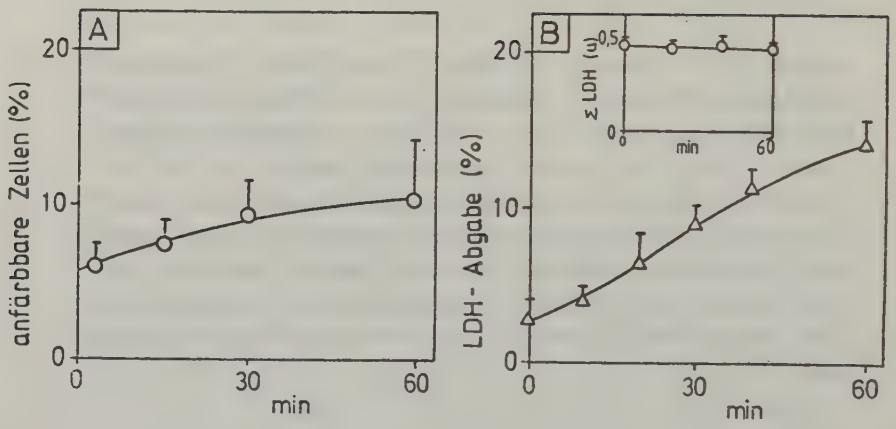


Abb. 2:

ANFÄRBUNG MIT TRYPANBLAU UND FREISETZUNG VON LDH

Isolierte Enterozyten (2 mg Protein) wurden unter Rühren bei 37°C in 2 ml MEM inkubiert. Zur Bestimmung der Anfärbbarkeit mit Trypanblau wurden zu verschiedenen Zeiten 50 µl der Suspension entnommen und auf die Zählkammer gegeben (A). Zur Bestimmung der LDH-Freisetzung wurden zu verschiedenen Zeiten 100 µl entnommen und nach Zentrifugation wurde der LDH-Gehalt in Medium und Zellsediment bestimmt (B). Die eingefügte Abbildung (B) zeigt die Summe der LDH-Aktivitäten in Medium und Zellen; sie ist in Enzymeinheiten angegeben. (SD, n = 7).

Die lichtmikroskopische Aufnahme von frisch isolierten Darmzellen (Abb. 3) zeigt, daß die Zellen als Einzelzellen oder in kleinen Zellverbänden vorliegen. Einige Zellen sind mit Trypanblau angefärbt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4 und 5), zeigen, daß die Zellen ihre Polarität erhalten (Abb. 4). Die Vergrößerung des oberen Teils einer Zelle (Abb. 5) zeigt einen intakten Bürstensaum und intakte Mitochondrien.

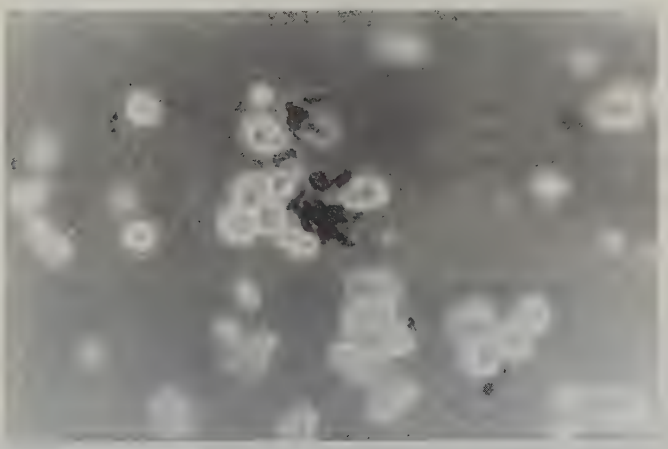


Abb. 3:

LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON FRISCH ISOLIERTEN DARMZELLEN

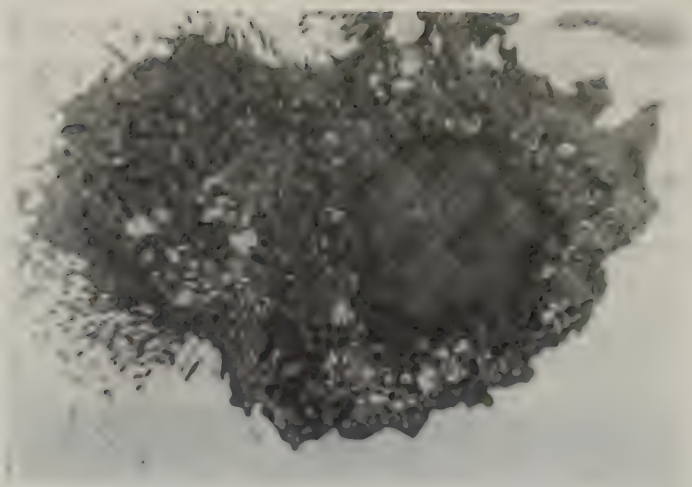


Abb. 4:

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER ISOLIERTEN DARMZELLE

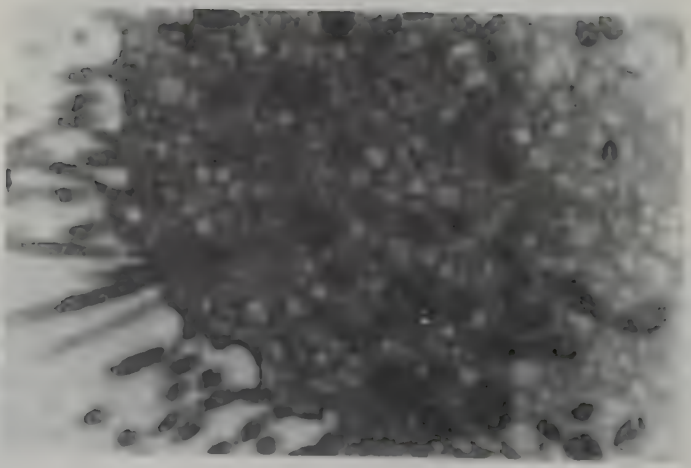


Abb. 5:

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DES BÜRSTENSAUMS EINER ISOLIERTEN DARMZELLE

Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein Zytoplasma-Enzym. Geschädigte Zellmembranen oder erhöhte Permeabilität der Zellmembran ermöglichen eine LDH-Freisetzung ins Medium. Frisch isolierte Zellen verlieren etwa 5 % LDH ins Medium. Wenn die Zellen bei 37°C unter Rühren eine Stunde lang inkubiert wurden, verloren sie etwa 13 % LDH ins Medium (Abb. 2 B). Die Gesamtaktivität des LDH Enzyms in Zellen und Medium blieb aber konstant (Abb. 2 B, eingefügtes Zeichnen).

Zellen in der Vorratssuspension bei 0°C verlieren ihr K^+ ins Medium. Wenn die Zellen bei 37°C inkubiert werden nimmt die intrazelluläre K^+-Konzentration zu bis zu 90 mM in 20 Minuten (Abb. 6). Hemmung der membrangebundenen Na^+-K^+-ATPase mit Oubain hat zur Folge, daß die Aufnahme von K^+gehemmt wird. Bei geschädigter Zellmembran, kann die Zelle kein K^+ aufnehmen.

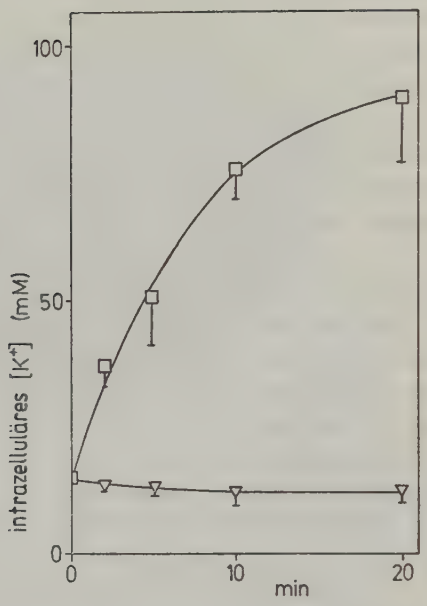


Abb. 6:

K^+-AKKUMULATION

Isolierte Enterozyten (2 mg Protein) wurden unter Rühren bei 37°C in 2 ml MEM inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 200 µl entnommen und die Zellen wurden durch Silikonölzentrifugation vom Medium getrennt. Die K^+-Konzentration im Zellsediment wurde flammenphotometrisch bestimmt.

(□) K^+ in der Kontrollinkubation;

(▽) K^+ in Anwesenheit von 200 µM Ouabain

Die Darmzellen konnten Uridin und Phenylalanin aufnehmen und einbauen. Abb. 7 zeigt einen linearen Verlauf des Uridin-Einbaus (Abb. 7 A) und Phenylalanin-Einbaus (Abb. 7 B) über 40 Minuten. Der Einbau wurde durch Antimycin A (AA) vollkommen gehemmt.

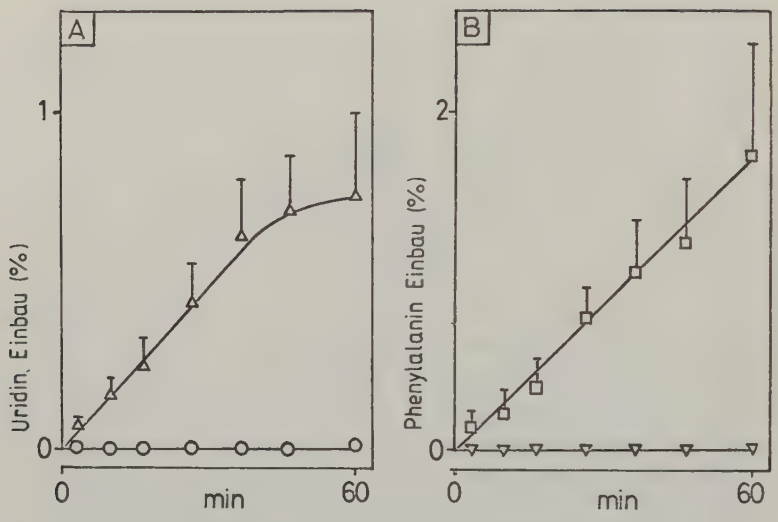


Abb. 7:

EINBAU VON URIDIN UND PHENYLALANIN

Isolierte Enterozyten (2 mg Protein) wurden unter Rühren bei 37°C in 2 ml MEM inkubiert. Nach 10 Minuten wurde entweder ^{3}H-Uridin (0,5 µCi, 200 pMol) (linke Abbildung), oder ^{3}H-Phenylalanin (0,5 µCi, 200 pMol) (rechte Abbildung) zugegeben. Proben von je 200 µl wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und in 5 ml Trichloressigsäure (5 M) überführt. Die Radioaktivität im säurefällbaren Material wurde ermittelt.

(Δ) Uridin in der Kontrollinkubation, (○) Uridin in Anwesenheit von Antimycin A (5 µg/ml), (□) Phenylalanin in der Kontrollinkubation, (▽) Phenylalanin in Anwesenheit von Antimycin A (5 µg/ml).

SD, n = 7 Präparationen.

Abb.8a zeigt den O_2-Verbrauch einer frischen Darmzellpräparation. Die Geschwindigkeit der Grundatmung betrug 9± 2.nMol/mg Prot. x Min. Die Intaktheit der Mitochondrien wurde durch Zugabe von Oligomycin (Hemmer der mitochondrialen ATP-Synthese) und FCCP (Entkoppler) geprüft. Oligomycin hemmte und FCCP stimulierte die Atmung. Rotenon blockiert den Elektronentransport in der Atmungskette bei Coenzym Q. Durch anschließende Gabe von Succinat kann der Rotenon-Block aufgehoben werden. Succinat steigert die Atmung nur bei Zellen, die an der Membran geschädigt sind (37). Bei Zellen von guter Vitalität ist die Atmungssteigerung nach Succinatzugabe sehr gering. Abb.8b zeigt die Atmungskette der Mitochondrien mit den Hemmern und den Orten ihrer Wirkung.

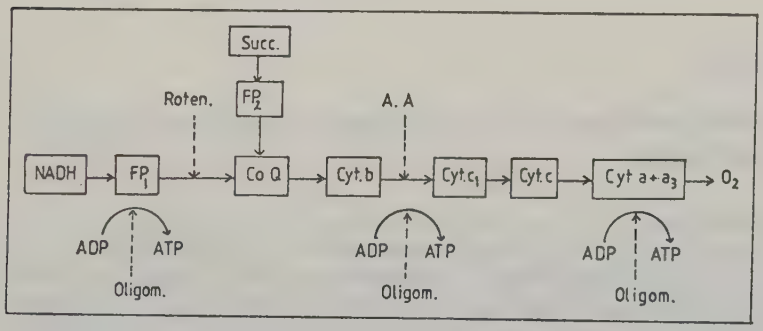


Abb. 8b:

DIE ATMUNGSKETTE.LOKALISATION DER HEMMUNGSSTELLEN DURCH ROTENON = Roten., ANTIMYCIN A = AA, UND OLIGOMYCIN = Oligom.

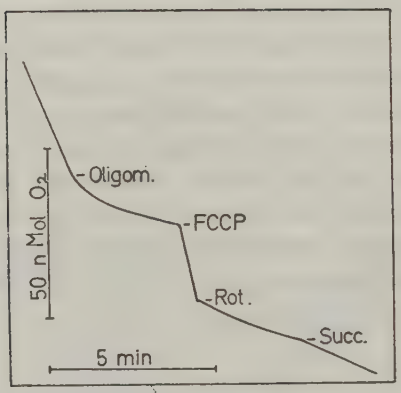


Abb. 8:

SAUERSTOFFVERBRAUCH VON ISOLIERTEN DARMZELLEN VOM MEERSCHWEINCHEN

Enterozyten (1,5 mg Protein) wurden in 750 µl MEM unter Rühren bei 37°C in einem geschlossenen Gefäß inkubiert. Der Sauerstoffverbrauch, gemessen mit der Clark-Elektrode, wurde registriert. Folgende Zugaben wurden mit einer Hamilltospritze durch eine Kerbe im Deckel des Gefäßes gemacht: Oligom. = 20 µg Oligomycin, FCCP = 0,5 µM Entkoppler, Rot. = 2 µM Rotenon, Succ. = 2 mM Succinat.

3.1.2. Darmzellen vom Menschen

Die Darmpräparate stammten aus Colon und Rektum. Da diese Darmteile viele mukusproduzierende Zellen enthalten, waren die Zellpräparationen nur für bestimmte Vitalitätstests (O_2-Verbrauch) geeignet. Abb. 9 zeigt den O_2-Verbrauch einer menschlichen Darmzellpräparation. Die Beurteilung wurde wie bei Meerschweinchen-Darmzellen vorgenommen. Die Geschwindigkeit der Grundatmung betrug 35.2 ±9 nMol/mg prot./min. (n=4).

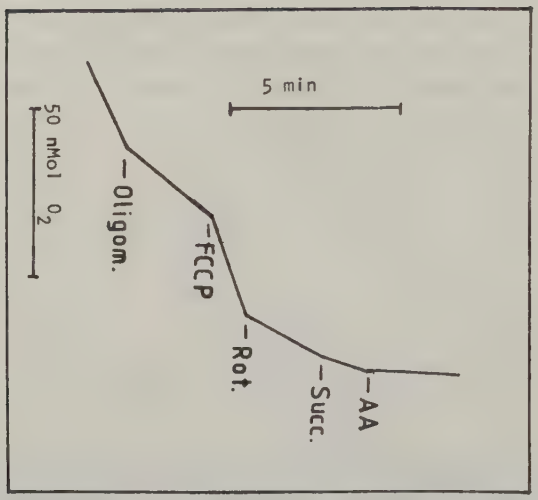


Abb. 9:

SAUERSTOFFVERBRAUCH VON ISOLIERTEN DARMZELLEN VOM MENSCHEN

Die Messung erfolgte wie in Abbildung 8 beschrieben.

AA = Antimycin A .

3.2. Transport verschiedener Substanzen in Meerschweinchen-Darmzellen

3.2.1. Gallensäuren

3.2.1.1. Lokalisation der Aufnahme im Darm

Abb. 10 zeigt die Aufnahme von 4 repräsentativen Gallensäuren in Zellen aus verschiedenen Abschnitten des Dünndarms. Taurocholat wurde ausschließlich von Zellen des distalen Ileum aufgenommen. Cholat wurde von Zellen aus allen Dünndarmabschnitten, aber vorwiegend von Zellen des distalen Ileum aufgenommen. Chenodeoxycholat und Lithocholat wurden sehr schnell von Zellen aus allen Dünndarmabschnitten aufgenommen.

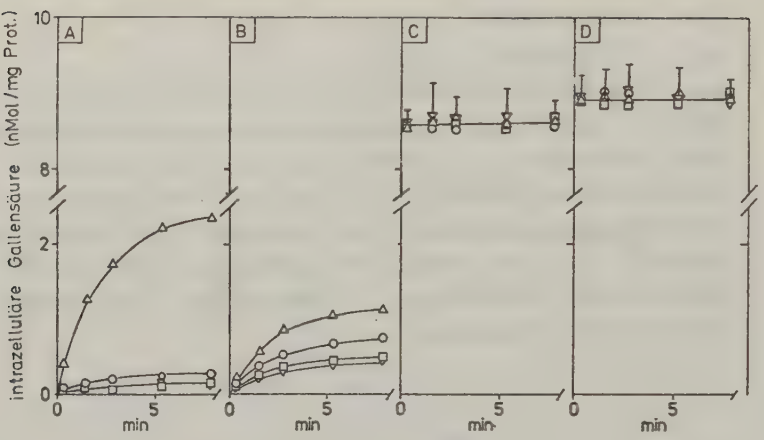


Abb. 10:

GALLENSÄUREAUFNAHME IN ISOLIERTE DARMZELLEN AUS VERSCHIEDENEN ABSCHNITTEN DES DÜNNDARMS.

Darmzellen (1,5 mg Protein) aus 4 verschiedenen Darmabschnitten wurden in 1,5 ml Eagle's Medium bei pH 7,3 und 37°C unter Rühren 15 Minuten vorinkubiert.
Beim Zeitpunkt 0 wurden Gallensäuren (15 nMol) zugegeben. 200 µl Proben wurden entnommen und sofort, wie in den Methoden (2.9.) beschrieben, zu den angegebenen Zeiten abzentrifugiert.

(A) Taurocholat, (B) Cholat, (C) Chenodeoxycholat, (D) Lithocholat.

(▽) Zellen aus proximalem Jejunum; (□) Zellen aus distalem Jejunum; (○) Zellen aus proximalem Ileum; (△) Zellen aus distalem Ileum.

3.2.1.2. Na^+-Abhängigkeit der Aufnahme

Zur Untersuchung der Na^+-Abhängigkeit wurde ein modifiziertes Inkubationsmedium (Eagle's Medium) hergestellt, bei dem das Na^+ durch K^+ ersetzt worden war. Zellen aus dem distalen Ileum, wo ein Na^+-abhängiger Transport zu erwarten war wurden für diese Untersuchungen benutzt. Abb. 11 zeigt, daß die Aufnahmegeschwindigkeit von Taurocholat in Na^+-freiem Eagle's Medium sehr stark vermindert (89 % Hemmung); die Cholataufnahme war etwa 50 % verlangsamt. Im Gegensatz dazu wurden Chenodeoxycholat und Lithocholat durch Na^+-freies Medium nicht beeinflußt.

Die Ergebnisse dieser und weiterer Versuche zum Transportmechanismus von Chenodeoxycholat und Lithocholat (nicht sättigbar, nicht energieabhängig) zeigen, daß diese beiden Gallensäuren vorwiegend durch passive Diffusion aufgenommen werden. Ein möglicherweise vorhandener Aktiver Transport wurde durch die schnelle Diffusion verdeckt.

Umgekehrt war bei Cholat und insbesondere Taurocholat die passive Diffusion sehr langsam, so daß der spezifische Transport im distalen Ileum die Diffusion bei weitem überwog. Deswegen wurden Taurocholat und Cholat verwendet, um den spezifischen Gallensäurecarrier in Zellen des distalen Ileum weiter zu charakterisieren.

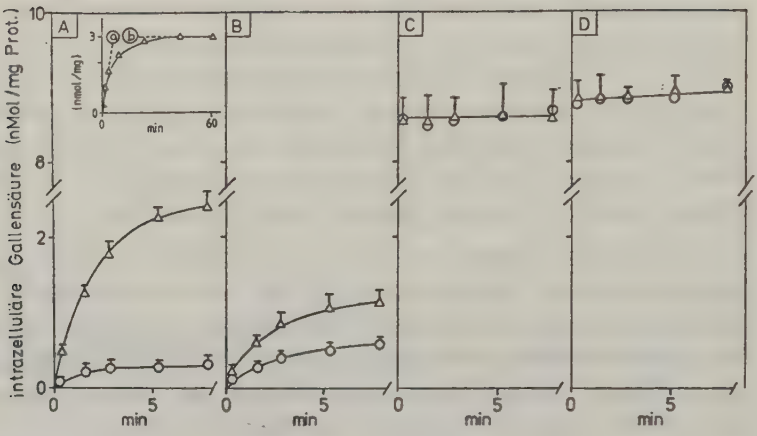


Abb. 11:

ZEITLICHER VERLAUF DER GALLENSÄURENAUFNAHME UND IHRE ABHÄNGIGKEIT VON NA^+

Darmzellen (1,5 mg Protein) aus distalem Ileum wurden entweder in Eagle's Medium (Δ) oder in Na^+-freiem Eagle's Medium (O) 15 Minuten bei 37°C und pH 7,3 vorinkubiert. Gallensäuren (15 nMol) wurden zugegeben und die Aufnahme wurde, wie in den Methoden (2.9.) beschrieben, gemessen.

(A) Taurocholat, (B) Cholat, (C) Chenodeoxycholat, (D) Lithocholat.

3.2.1.3. Zeitlicher Verlauf

Die eingefügte Darstellung in Abb. 11 (A) zeigt wie der zeitliche Verlauf des Transports von Taurocholat in die Zellen ermittelt wurden. Die Aufnahmegeschwindigkeit war zu Beginn der Inkubation am höchsten; sie nahm dann stetig ab, bis nach 30 Minuten annähernd eine maximale intrazelluläre Konzentration erreicht war. Die Anfangssteigerung (a) entspricht der initialen Geschwindigkeit der Aufnahme. Die Waagerechte (b) gibt die maximale intrazelluläre Konzentration an. Der aufgenommene Anteil betrug in diesem Falle 3 nMol/mg Protein. Das intrazelluläre wäßrige Volumen betrug 4,2 µl/mg Protein (siehe die Methoden 2.6.3.). Wenn man dieses Volumen in Betracht zieht, entspricht die aufgenommene Menge einer intrazellulären Konzentration von 710 µM Taurocholat. Taurocholat ist also etwa 90-fach in der Zelle angereichert worden. (Die extrazelluläre Taurocholatkonzentration war 7,9 µM).

3.2.1.4. Sättigbarkeit

Zur Darstellung der Sättigbarkeit und zur Ermittlung der kinetischen Konstanten der Taurocholat- und Cholataufnahme wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme bei verschiedenen Konzentrationen im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Abb. 12 zeigt, daß die Aufnahme von Taurocholat (A) und Cholat (B) sättigbar ist. Die scheinbaren kinetischen Konstanten für Taurocholat waren: K_m = 231 $\pm$ 27 µM, V = 7 $\pm$ 0,71 nMol/mg Protein/Min. und für Cholat K_m = 240 $\pm$ 54 µM, V = 3,1 $\pm$ 0,7 nMol/mg Protein x Min.

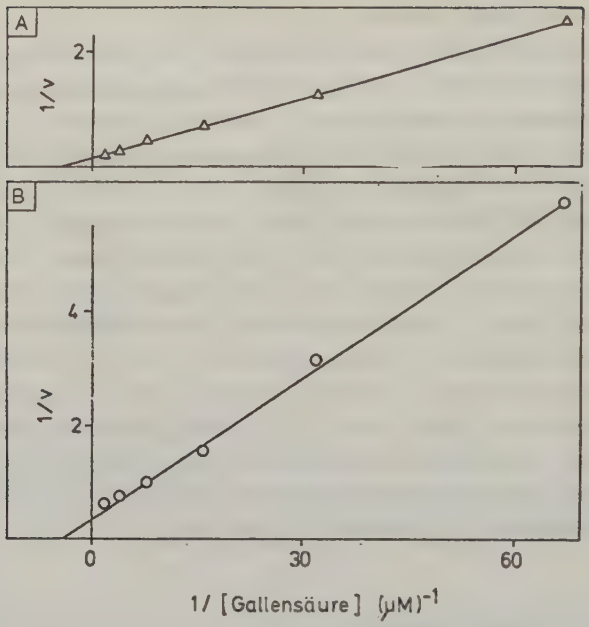


Abb. 12:

LINEWEAVER-BURK-DIAGRAMM DER AUFNAHME VON TAUROCHOLAT UND CHOLAT

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme in distalen Ileumzellen von 6 verschiedenen Taurocholat- und Cholat-Konzentrationen, wurden im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen.

V ist ausgedrückt in nMol/mg Prot. x Min und S in µM.

(A) Taurocholat, (B) Cholat.

3.2.1.5. Einfluß von metabolischen Hemmern

Um Informationen über die Energieabhängigkeit der Aufnahme zu erhalten wurde Antimycin A oder FCCP oder Ouabain (Strophantin G) nach verschiedenen Zeiten zur Zellsuspension pipettiert. Abbildung 13 zeigt eine starke Erniedrigung der Transportraten durch alle diese metabolische Hemmer; die Hemmung war wirksamer, wenn die Zellen für längere Zeiten mit den hemmenden Substanzen vorinkubiert wurden.

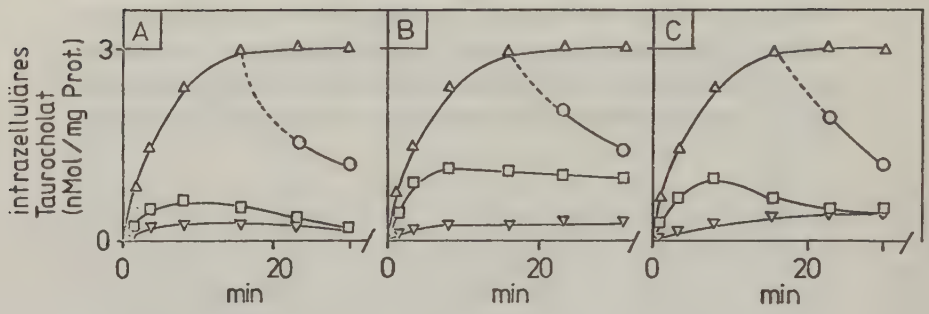


Abb. 13:

ZEITLICHER VERLAUF DER TAUROCHOLATAUFNAHME UND IHRE HEMMUNG DURCH ANTIMYCIN A, FCCP UND OUABAIN

Zellen (1,5 mg Protein) aus dem distalen Ileum wurden in 1,5 ml Eagle's Medium 15 Minuten bei 37°C und pH 7,3 vorinkubiert. Taurocholat (15 nMol) wurde dann zugegeben. (A) Antimycin A (5 µg/ml; (B) FCCP (1 µM) und (C) Ouabain (200 µM) wurden nach den folgenden Zeiten zugegeben:

(▽) 15 Minuten vor Taurocholat; (□) gleichzeitig mit Taurocholat; (○) 16 Minuten nach Taurocholat. (△) Kontrolle (ohne Inkubator).

3.2.1.6. Kompetitive Hemmung

Um Informationen über die Strukturspezifität des Transportes zu erhalten, wurde untersucht, ob die aktive Aufnahme von Taurocholat in distalen Darmzellen durch andere strukturähnliche Substanzen (Taurin, Cholat, Taurochenodexoycholat) kompetitiv beeinflußt wird.

Abbildung 14 zeigt, daß Taurin, selbst in sehr hoher Konzentration (10 mM), keine Wirkung auf die Aufnahme hatte.

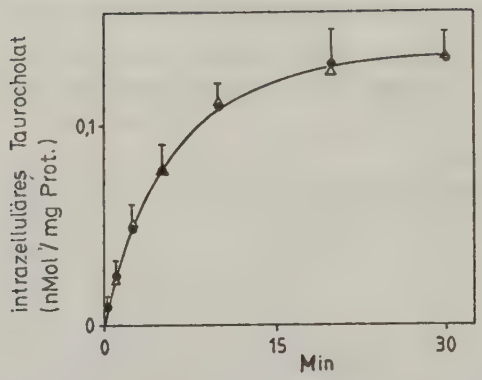


Abb. 14:

EINFLUß VON TAURIN AUF DIE TAUROCHOLATAUFNAHME.

Ileumzellen (1,5 mg Protein) wurden in Eagle's Medium 15 Minuten unter Rühren bei 37°C vorinkubiert. Dann wurde Taurocholat (1 µM) zugegeben. Taurin (10 mM) wurde gleichzeitig mit Taurocholat zugegeben.

(●) Kontrolle, (Δ) in Anwesenheit von Taurin

Abbildung 15 A stellt die Aufnahme von Taurocholat unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen von Cholat dar. Sie zeigt, daß die Taurocholat-Aufnahme durch Cholat gehemmt wurde und daß die Hemmung konzentrationsabhängig war.

Abbildung 15 B zeigt ein Lineweaver-Burk-Diagramm der Anfangsgeschwindigkeiten aus Abb. 15 A und zusätzlicher Werte bei anderen Taurocholat-Konzentrationen. Der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden auf der y-Achse (V_{max}) weist darauf hin, daß die Hemmung kompetitiv ist.

Wenn die Ergebnisse aus Abb. 15 in einem Dixon Plot aufgetragen werden (nicht getzeigt), so ließt sich die Hemmkonstante ermitteln : K_i = 60 uM (Cholat)

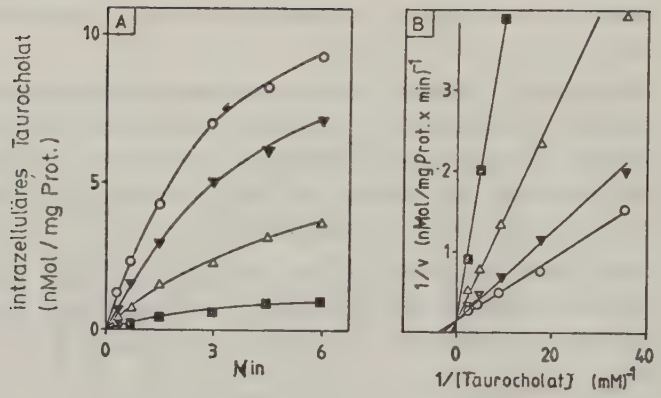


Abb. 15:

EINFLUß VON CHOLAT AUF DIE TAUROCHOLATAUFNAHME

(A) Ileumzellen (1,5 mg Protein) wurden in Eagle's Medium bei 37°C unter Rühren 15 Minuten vorinkubiert. Taurocholat (50 µM) wurde dann zugegeben und die Aufnahme gemessen. Cholat wurde in den folgenden Konzentrationen 5 Sekunden vor Taurocholat gegeben:

(○) 0 µM, (▼) 50 µM, (△) 150 µM, (■) 500 µM

(B) Lineweaver-Burk-Diagramm für die Taurocholat-Aufnahme und ihre Hemmung durch Cholat. Cholat-Konzentrationen wurden wie bei (A) bezeichnet.

Taurochenodeoxycholat wirkte ebenfalls als kompetitiver Hemmer. Die Auftragung der reziproken Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit steigender Taurocholat-Konzentrationen nach Dixon (43) ergibt einen gemeinsamen Schnittpunkt der Geraden mit einem K_i von 26 µM Taurochenodeoxycholat (Abb. 16).

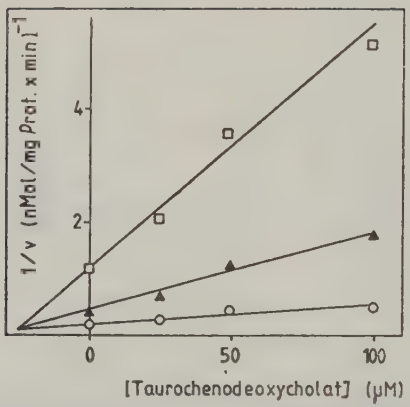


Abb. 16:

DIXON-DIAGRAMM DER TAUROCHOLAT-AUFNAHME ZUR BESTIMMUNG DES K_i-WERTES VON TAUROCHENODEOXYCHOLAT

Die reziproken Anfangsgeschwindigkeiten der Taurocholat-aufnahme in Anwesenheit von verschiedenen Taurochenodeoxy-cholat-Konzentrationen wurden gegen die Taurochenodeoxy-cholat-Konzentrationen aufgetragen. Die Taurocholat-Kon-zentrationen waren:

(□) 40 µM, (▲) 100 µM, (○) 250 µM.

3.2.1.7. Einfluß der Temperatur

Um weitere Informationen über die treibenden Kräfte der Aufnahme zu erhalten, wurden Inkubationen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt.

Abbildung 17 A stellt den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Taurocholat in Ileumzellen bei 4 verschiedenen Temperaturen dar. Bei Erniedrigung der Temperatur nimmt die Aufnahmegeschwindigkeit ab. In Abbildung 17 B sind die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme als Funktion der Temperatur, in Ileum-Zellen und Jejunum-Zellen aufgetragen. Nur die Aufnahme in Ileum-Zellen war temperaturabhängig.

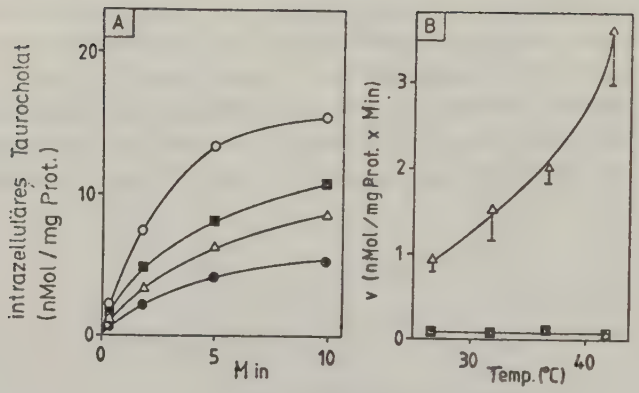


Abb. 17:

TEMPERATUR-ABHÄNGIGKEIT DER TAUROCHOLATAUFNAHME

Darmzellen (1,5 mg Protein) wurden in Eagle's Medium unter Rühren bei 37°C 14 Minuten vorinkubiert; dann wurden die Temperaturen der Medien auf den gewünschten Wert eingestellt und 1 Minute später wurde Taurocholat (50 µM) zugegeben.

(A) Zeitlicher Verlauf der Taurocholataufnahme in Ileumzellen bei (●) 27°C, (△) 32°C, (■) 37°C, (○) 42°C.

(B) Anfangsgeschwindigkeit der Taurocholataufnahme bei verschiedenen Temperaturen in (△) Ileumzellen, (■) Jejunumzellen.

3.2.1.8. Einfluß des p^H

Abb. 18 A zeigt den Zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Taurocholat bei 6 verschiedenen p^H- Werten in Ileumzellen.

In Abb. 18 B sind die Anfangsgeschwindigkeiten dieser Kurven und zusätzlicher Kurven von jejunumzellen als Funktion des p^H-Werts dargestellt. Diese Kurvenverläufe zeigen, daß es kein p^H- Optimum innerhalb der physiologischen p^H- gibt . Damit ist es leider nicht möglich, eine Auskunft über den pK- Wert der postulirten kationischen Bindestelle des Carrier zu ermitteln. Unter dem pH- wert von 5 nimmt die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme in Ileum- und Jejunumzellen zu, dies spricht dafür, daß bei niedrigen pH-Wert die unspezifische Diffusion begünstigt wird.

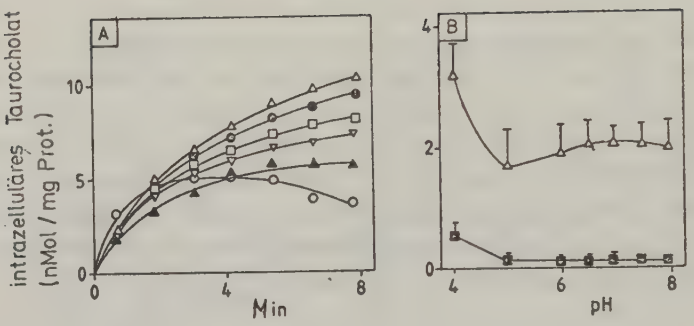


Abb. 18:

pH-ABHÄNGIGKEIT DER TAUROCHOLATAUFNAHME

Darmzellen (1,5 mg Protein) wurden in Eagle's Medium bei pH 7,3 und 37°C 14 Minuten vorinkubiert. Dann wurden die gewünschten pH-Werte eingestellt. Eine Minute später wurde Taurocholat (50 µM) zugegeben und die Aufnahme gemessen.

(A) Zeitlicher Verlauf der Taurocholataufnahme bei pH: (○) 4, (▲) 5, (▽) 6, (○) 6,5 , (▲) 7, (□) 7,5 , 8,0

(B) Anfangsgeschwindigkeit der Taurocholataufnahme in Abhängigkeit des pH in (△) Ileumzellen und (■) Jejunumzellen.

3.2.2. Cholin

3.2.2.1. Lokalisation der Aufnahme im Darm und zeitlicher Verlauf

Abbildung 19 (Kontrolle) zeigt die Aufnahme von Cholin in Zellen aus dem distalen (A) und proximalen (B) Abschnitt des Dünndarms. Cholin wurde von Zellen aus distalem Darm und Zellen aus proximalem Darm gleich schnell aufgenommen. Nach 10 Minuten wurde etwa 28 pMol/mg Protein aufgenommen. Diese Menge entspricht einer intrazellulären Konzentration von 6,7 µM (das intrazelluläre wäßrige Volumen betrug 4,2 µl/mg Protein). Cholin war also nach 10 Minuten etwa 110-fach in die Zelle akkumuliert worden. (Die extrazelluläre Cholin-Konzentration war 0,06 µM).

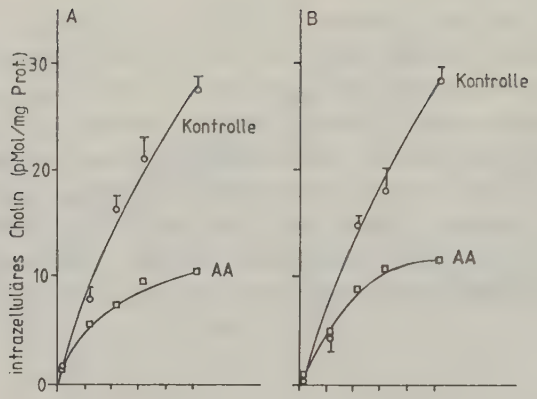


Abb. 19:

ZEITLICHER VERLAUF DER AUFNAHME VON CHOLIN UND IHRER HEMMUNG DURCH ANTIMYCIN A

Zellen (2 mg Protein) aus proximalem Darm (A) und aus distalem Darm (B) wurden in 1,5 ml Hank's Medium bei pH 7,3 und 37°C unter Rühren 15 Minuten vorinkubiert.

Beim Zeitpunkt 0 wurden 5 µl Cholin (100 pMol) zugegeben. Antimycin A (AA) (5 µg/ml) wurde 5 Minuten vor Cholin zur Inkubationssuspension gegeben. 200 µl Proben wurden entnommen und sofort wie in den Methoden (2.9.) beschrieben zu den angegebenen Zeiten zentrifugiert.

(○) Kontrolle, (□) Cholin in Anwesenheit von Antimycin A.

3.2.2.2. Wirkung von Ouabain auf die Aufnahme

Um den Einfluß der Na^+-K^+-ATPase und damit des für die Errichtung des Na^+-Gradienten verantwortlichen Membranproteins auf die Cholin-Aufnahme zu studieren, wurden Versuche mit dem Blocker der Na^+-K^+-ATPase, Ouabain durchgeführt. Ouabain (200 µM) wurde während der Präinkubation zugegeben. Abbildung 20 zeigt, daß Ouabain die Aufnahme von Cholin in distalen Zellen um 80 % und in proximalen Zellen um 45 % hemmt.

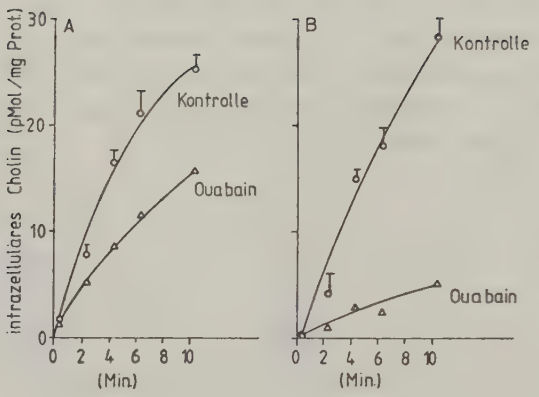


Abb. 20:

ZEITLICHER VERLAUF DER AUFNAHME VON CHOLIN UND IHRER HEMMUNG DURCH OUABAIN

Zellen (2 mg Protein) aus proximalem Darm (A) und aus distalem Darm (B) wurden inkubiert wie in Abb. 18 beschrieben.

Ouabain (200 µM) wurde 5 Minuten vor Cholin zugegeben.

(○) Kontrolle, (△) Cholin in Anwesenheit von Ouabain.

3.2.2.3. Energieabhängigkeit der Aufnahme

Um die Energieabhängigkeit der Aufnahme zu testen wurde Antimycin A (AA, 5 µg/ml) 10 Sekunden vor der Zugabe von Cholin zur Zellsuspension pipettiert.

Abbildung 19 zeigt eine Verminderung der Aufnahmegeschwindigkeit durch AA um 60 % sowohl in distalen (B) als auch in proximalen (A) Darmzellen. Also spielt die mitochondriale Atmung, die durch AA gehemmt wird, eine wichtige Rolle als Energiequelle für die Akkumulation von Cholin in Darmzellen.

3.2.2.4. Sättigbarkeit

Wie bei Taurocholat wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Cholin-Aufnahme bei verschiedenen Konzentrationen von Cholin im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen (Abb. 21). Die Aufnahme von Cholin war sättigbar. Es läßt sich ein scheinbarer K_m-Wert von 119 µM und ein V_{max} von 200 pMol/mg/min ermitteln.

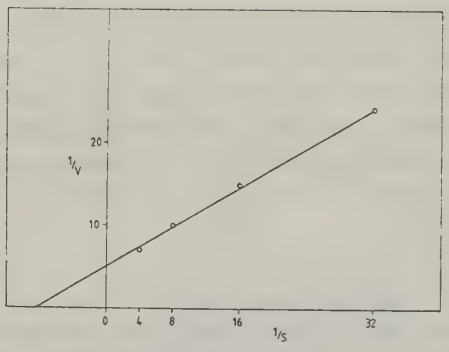


Abb. 21:

LINEWEAVER-BURK-DIAGRAMM FÜR DIE AUFNAHME VON CHOLIN

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme von 4 verschiedenen Cholin-Konzentrationen wurden im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen.

V ist ausgedrückt in nMol x mg Protein^{-1} x Min.$^{-1}$ und S in mM Cholin.

3.2.3. Riboflavin

3.2.3.1. Zeitlicher Verlauf und Lokalisation der Aufnahme im Darm.

Abbildung 22 (bei 37°C), zeigt den Zeitverlauf der Riboflavin-Aufnahme in Darmzellen aus Jejunum (A) und Ileum (B). Nach etwa 20 Minuten Inkubationszeit betrug die Aufnahme 8,5 pMol/mg Protein in Jejunum und 9,8 pMol/mg Protein in Ileum. Diese Werte entsprechen intrazellulären Konzentrationen von 2 µM in Darmzellen aus Jejunum und 2,3 µM in Darmzellen aus Ileum. Da die extrazelluläre Riboflavin-Konzentration bei 0,32 µM lag, hatte eine 6,3-fache Akkumulation in Jejunum-Zellen und eine 7,2-fache in Ileum-Zellen stattgefunden.

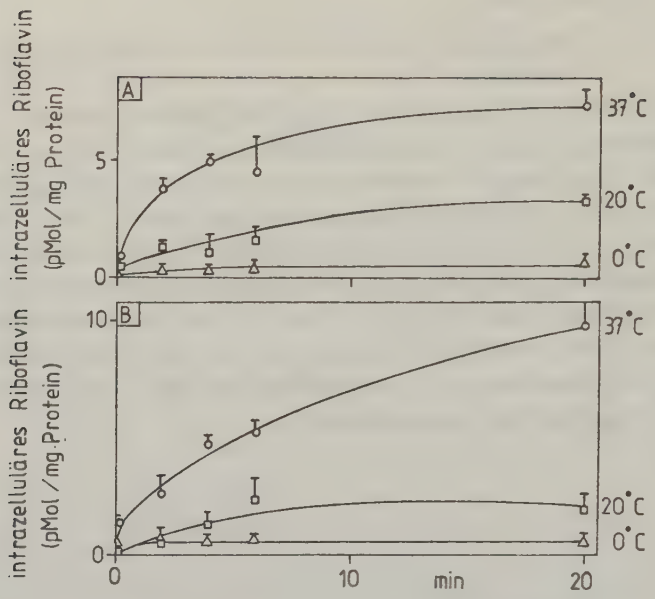


Abb. 22:

ZEITLICHER VERLAUF DER AUFNAHME VON RIBOFLAVIN UND EINFLUß DER TEMPERATUR

Zellen (2 mg Protein) aus Jejunum (A) und Ileum (B) wurden in 1,5 ml Hank's Medium bei pH 7,3 und verschiedenen Temperaturen, 37°C (○), 20°C (□) und 0°C (△) unter Rühren 10 Minuten vorinkubiert. Riboflavin (0,32 µM) wurde zugegeben. Die Aufnahme wurde, wie in den Methoden (2.9.) beschrieben, gemessen.

3.2.3.2. Na^+-Abhängigkeit der Aufnahme

Darmzellen wurden im modifizierten Hank's Medium, bei dem das Na^+ durch K^+ ersetzt war, inkubiert.

Abbildung 23 zeigt eine starke Verminderung der Aufnahmegeschwindigkeit von Riboflavin in Na^+-freien Hank's Medium in Jejunum- (A) und Ileum-Zellen (B). Um weitere Informationen über die Beteiligung der Na^+-Pumpe an der Aufnahme zu erhalten, wurde die Wirkung von Ouabain (Na^++ K^+-ATPase-Hemmer) auf die Aufnahme getestet. Ouabain (200 µM) zeigt einen ähnlichen deutlichen Hemmeffekt wie Na^+-freies Hank's Medium (Abb. 23).

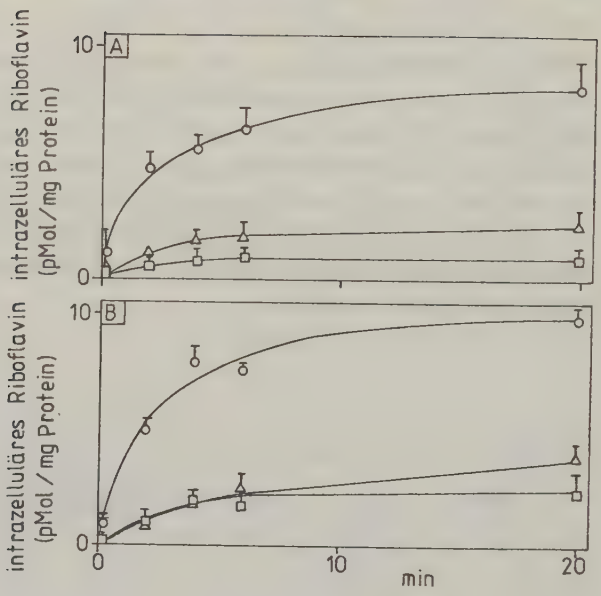


Abb. 23:

ZEITLICHER VERLAUF DER RIBOFLAVIN-AUFNAHME.
EINFLUß VON NATRIUM UND OUABAIN.

Zellen (2 mg Protein) aus Jejunum (A) und Ileum (B) wurden entweder in Na^+-freiem Hank's Medium oder in Anwesenheit von Ouabain (200 µM) 10 Minuten lang bei 37°C und pH 7,3 vorinkubiert. Riboflavin (0,32 µM) wurde zugegeben und die Aufnahme wurde gemessen.

(○) Kontrolle, (□) Na^+-freies Medium, (Δ) in Anwesenheit von Ouabain.

3.2.3.3. Sättigbarkeit

Die Anfangsgeschwindigkeit der Riboflavinaufnahme in Jejunum-Zellen (A) und Ileum-Zellen (B) bei verschiedenen Konzentrationen von Riboflavin wurden im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen (Abb. 24).

In beiden Zellfraktionen (Ilumzellen,Jejunumzellen)war die Riboflavin-Aufnahme sättigbar. Die scheinbaren kinetischen Konstanten waren:

K_m = 70 nM, V = 1,6 pMol/mg Protein/Min. und in Ileum-Zellen K_m = 87 nM, V = 1,82 pMol/mg Protein/Min.

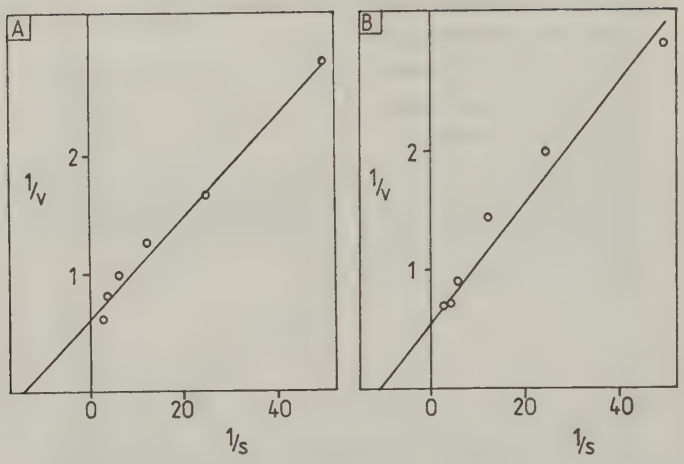


Abb. 24:

LINEWEAVER-BURK-DIAGRAMM DER RIBOFLAVIN-AUFNAHME.

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme von 6 verschiedenen Riboflavin-Konzentrationen in Jejunum-Zellen (A) und Ileum-Zellen (B) wurden im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen.

V ist ausgedrückt in pMol/mg Protein x Min. und

S in µM Riboflavin.

3.2.3.4. Energieabhängigkeit der Aufnahme

Abbildung 25 zeigt eine deutliche Verminderung der Aufnahme-Geschwindigkeit durch Antimycin A (AA) in Jejunum-Zellen (A) und Ileum-Zellen (B). Dieser Hemmeffekt deutet darauf hin, daß die Aufnahme energieabhängig ist und daß das mitochondriale ATP die wichtigste Energiequelle für die Akkumulation von Riboflavin darstellt.

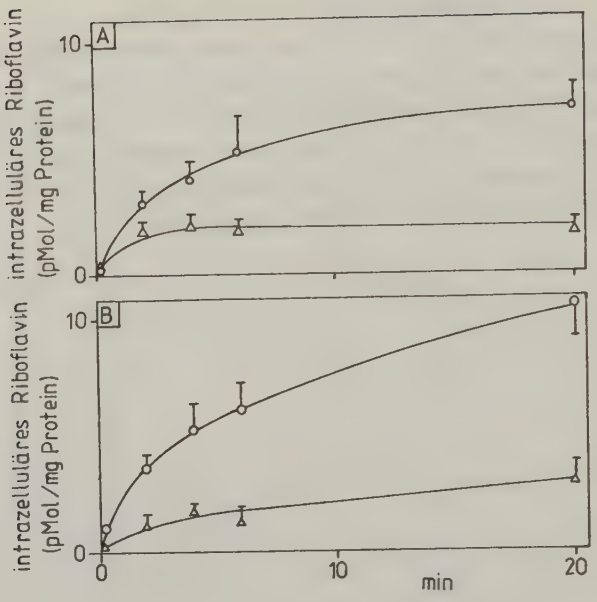


Abb. 25:

ZEITLICHER VERLAUF DER RIBOFLAVIN-AUFNAHME UND IHRER HEMMUNG DURCH ANTIMYCIN A

Zellen (2 mg Protein) aus Jejunum (A) und Ileum (B) wurden in 1,5 ml Hank's Medium bei 37°C und pH 7,3 10 Minuten lang vorinkubiert. Antimycin A (AA) (5 µg/ml) wurde 5 Minuten vor Riboflavin (0,32 µM) zugegeben. Die Aufnahme wurde, wie in den Methoden (2.9.) beschrieben, gemessen.

(O) Kontrolle, (Δ) in Anwesenheit von Antimycin A

3.2.3.5. Einfluß der Temperatur

Um weitere Informationen über die treibenden Kräfte des Transportes zu erhalten, wurde die Aufnahme bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Abbildung 22 zeigt, daß die Aufnahmegeschwindigkeit mit fallender Temperatur stark abnahm. Die Temperaturabhängigkeit der Aufnahme dient als weiterer Beweiß für einen spezifischen Transport für Riboflavin.

3.3. Konjugation von Äthinylöstradiol in Meerschweinchen-Darmzellen.

Um die Eignung von isolierten Darmzellen für die Untersuchung des intestinalen Fremdstoff-Metabolismus zu demonstrieren, wurde die Konjugation von Äthinylöstradiol in Darmzellen untersucht.
Abbildung 26 (A - B) stellt die zeitlichen Verläufe der Äthinylöstradiol-Aufnahme und die Bildung von wasserlöslichen Metaboliten in einem Kontrollexperiment und nach Zugabe von Antimycin A dar. In beiden Versuchen wurden etwa 50 % der zugegebenen Menge von Äthinylöstradiol rasch von den Zellen aufgenommen, was dafür spricht, daß die Aufnahme nicht aktiv ist. Mehr als 50 % der eingesetzten Menge wurde im Kontrollexperiment innerhalb von 30 Minuten konjugiert (wasserlösliche Metaboliten). Ein Teil dieser Konjugate wurde vorübergehend in den Zellen akkumuliert, und dann ins Medium abgegeben.

Die Konjugation von Äthinylöstradiol wurde durch Antimycin A gehemmt (Abb. 26, C - D).

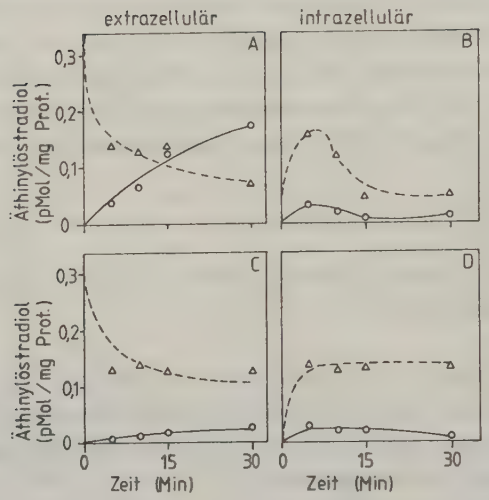


Abb. 26:

KONJUGATION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IN ISOLIERTEN DARMZELLEN VOM MEERSCHWEINCHEN.

Darmzellen (2,6 mg/ml Inkubat) wurden in MEM bei pH 7,3 und 37°C unter Rühren 10 Minuten vorinkubiert. Beim Zeitpunkt 0 wurden 10 µl Äthinylöstradiol (1 µM) zugegeben.

In C - D wurde der metabolische Hemmer Antimycin A (5 µg/ml) mit Äthinylöstradiol zugegeben. Proben von 200 µl wurden entnommen und nach 5,10,15,30 Minuten abzentrifugiert.

(Δ--- Δ) Chloroform-lösliche Aktivität (Äthinylöstradiol)

(O—— O) wasserlösliche Aktivität (Metabolite)

4. DISKUSSION

4.1. Isolierte Darmzellen als Modell für Transport und Metabolismus

In den letzten Jahren hat das Interesse an den Transportvorgängen und den metabolischen Leistungen des Darmes auf zellulärer Ebene stark zugenommen. Frühere Studien haben bereits die gute Eignung von isolierten Mukosazellen für derartige Untersuchungen bewiesen (44,45). Verschiedene Autoren verwenden unterschiedliche Isolierungsverfahren und unterschiedliche Spezies, wie Hamster (46), Hühnchen (12,47), Maus (48,49), Kaninchen (58), Ratte (13,15,20,21, 24,47) und Meerschweinchen (18,50,51). Aber bisher gibt es keine einfache Methode, welche Darmzellen in hoher Ausbeute, mit guter Qualität in homogener Suspension von Säugetieren liefert.

In Vorversuchen habe ich verschiedene Methoden zur Isolierung von Darmzellen aus der Ratte erprobt (16,18,22, 24,47). Leider waren die Ergebnisse unbefriedigend, da die Zellen Schleim sezernieren und dadurch verklumpten. Deswegen habe ich anschließend das Meerschweinchen verwendet, da es weniger Schleim produziert (18) als die Ratte. Unter verschiedenen erprobten Isolierungsverfahren ergab das von Weiser (24), das ursprünglich für die Ratte entwickelt worden war, die günstigsten Resultate. Dieses Verfahren wurde in der folgenden Weise modifiziert:

Erstens wurden alle Manipulationen des intakten Darmes bei 37°C durchgeführt, weil kalte Medien, die bei der Ratte angewandt werden können, beim Meerschweinchen zu Konstriktionen der Darmwand führen, so daß ein Spülen oder Füllen des Darmlumens unmöglich wird. Zweitens konnte die Behandlungsdauer mit Medium B von 50 auf 15 Minuten verkürzt werden, ohne daß dabei die Ausbeute vermindert wurde.

Dies war möglich durch das Betasten der Darmwand. So konnten Vitalitätsverluste, die bei längerer Inkubation in Medium B auftreten, vermindert werden. Drittens wurden die Zellen nach ihrer Ablösung durch ein feinmaschiges Tuch filtriert, so daß letzte Reste von Schleim entfernt wurden. Schließlich wurden die Zellen nur bei 50 g (anstatt 900 g) zentrifugiert, um eine mechanische Beschädigung durch hohe Beschleunigung zu vermeiden. Diese Modifikationen führten zu viel besseren Ausbeuten, als die ursprüngliche Methode. Außerdem waren die Suspensionen homogen und blieben auch bei längeren Inkubationen frei von Schleim.

Diese Zellen hatten eine ausgezeichnete Vitalität. Obgleich ihre Morphologie der von Enterozyten aus der Ratte (52,53) und der Maus (49,54) ähnelte, verloren diese Zellen weniger LDH als andere Präparationen (18,49,51,55). Die intrazelluläre K^+-Konzentration stieg bis zu 3-fach über bisher berichtete Werte (18) und erreichte Werte, wie man sie in isolierten Leberzellen findet (56). Dies zeigt, daß die Zellmembran funktionell intakt ist.

Die Aminosäure-Inkorporation in säurefällbares Material war höher, als die aus den Daten anderer Autoren berechneten Werte (16,19,55). Für Uridin gibt es bisher keine vergleichbaren Werte aus dem Darm; sein Einbau war vergleichbar mit dem in isolierten Leberzellen der Ratte (37). Der Einbau von Phenylalanin und Uridin zeigt an, daß die isolierten Zellen weiterhin Protein und RNA synthetisieren.

Die Werte für die Grundatmung isolierter Enterozyten, die man in der Literatur findet, reichen von 0 bis 23 nMol/mg Protein x Min. (14,15,18,19,47,53,57,58,59). Die Grundatmung sagt jedoch nur wenig über die Zellintegrität aus. Viel mehr Information erhält man, wenn man den funktionellen Zustand der intrazellulären Mitochondrien und ihre Substratversorgung durch Anwendung spezifischer Reagentien

ausgetestet. Die starke Inhibition durch Oligomycin (89 %) zeigt eine ausgezeichnete energetische Kopplung an, die sogar besser ist, als in isolierten Rattenleberzellen (60). Die Stimulierung der Atmung durch den Entkoppler FCCP über die Grundatmung hinaus veranschaulicht, daß die Zellen während der Grundatmung noch einen Überschuß an oxidierbaren Substraten besitzen. Die meisten dieser Substrate speisen ihre Elektronen in die Site 1 der Elektronentransportkette, wie man aus der starken Hemmung durch Rotenon schließen kann. Diese Analyse macht klar, daß die intrazellulären Mitochondrien intakt sind und kontrolliert atmen. Die geringe Stimulierung der Atmung durch Succinat ist ein zusätzlicher Hinweis auf eine gut erhaltene Zellintegrität (37,61).

Die für das Meerschweinchen entwickelte Methode ließ sich auch auf das menschliche Colon anwenden und führte hier ebenfalls zu Zellen guter Qualität. Die Methode kann aber sicher hinsichtlich der Ausbeute noch verbessert werden; auch ist es notwendig in künftigen Untersuchungen diese Zellen biochemisch weiter zu charakterisieren.

4.2. Lokalisation und Mechanismen der Transportvorgänge.

4.2.1. Gallensäuren

Der Gallensäurecarrier im Ileum unterscheidet sich von anderen bekannten Carriern hinsichtlich seiner Substratspezifität und seiner ausschließlichen Lokalisation im distalen Ileum. Es gibt drei verschiedene Hinweise darauf, daß der Gallensäure-Carrier in isolierten Ileumzellen vom Meerschweinchen noch erhalten ist: Erstens war die ausschließliche Lokalisation in Zellen des distalen Ileum identisch mit der Lokalisation in vivo (62,63) und in vitro (59,64,65,66). Zweitens war der scheinbare K_m-Wert in Übereinstimmung mit den Sättigungswerten, anderer Modelle (59,64,67,68,69). Drittens wurde die Aufnahme durch metabolische Hemmer blockiert und sie war Na^+-abhängig und temperaturabhängig in Übereinstimmung mit den Befunden von anderen Autoren (70).

Der folgende Vergleich zeigt, daß sich die isolierten Ileumzellen zur Untersuchung des Carrier-Mechanismus besser eignen als irgend ein anderes Modell: Erstens stimulierte Na^+ die Taurocholataufnahme 9-fach; höhere Werte (11-fach) wurden nur in Membranvesikeln unter Anwendung von maximalen Kationengradienten gefunden (66), wohingegen die Stimulierung in Darmsäcken (3-fach) (71) und Ileumzellen der Ratte (2,5-fach) (70) geringer war. Zweitens führte die Aufnahme von Taurocholat zu einer 90-fachen Konzentrationsdifferenz zwischen intrazellulärem Raum und Medium, verglichen mit einem Serosa/Mukosa Konzentrationsverhältnis von nur 13 - 15 in Darmsäcken (68, 72) und einer 10 - 20-fachen Akkumulation (40 nMol/Min x 100 mg Protein, 200 µM Gallensäure im Medium) in Ileumzellen der Ratte (59).

Schließlich ist es bisher mit keiner Präparation gelungen, echte Anfangsgeschwindigkeiten zu messen; die Zeitverläufe, die an Gallenfisteln (67), Darmsäcken (68) oder Darmschnitten (65) aufgenommen wurden, sind alle mit dem Problem behaftet, daß mehrere Kompartimente beteiligt sind, und ungerührte Schichten überwunden werden müssen, wohingegen Membranvesikeln (66,73,74,75,76) so schnell transportieren, daß Anfangsgeschwindigkeiten nicht bestimmt werden können. Demnach erlauben die Meerschweinchendarmzellen bislang als erstes Modell die gleichzeitige Messung der Kinetik und der Energetik des Gallensäuretransportes.

Während des enterohepatischen Kreislaufes werden die Gallensäuren durch Carrier im Ileum und in der Leber transportiert. Ein Vergleich zwischen dem Taurocholattransport in Ileumzellen vom Meerschweinchen mit dem in Leberzellen von der Ratte (39,77) zeigt, daß beide Vorgänge sättigbar sind. Aber die kinetischen Konstanten im Ileum (K_m = 231 µM; V = 7 nMol/mg Prot. x Min.) unterscheiden sich beträchtlich von denjenigen in der Leber (K_m = 19 µM; V = 1,7 nMol/mg Prot. x Min.). Beide Transportvorgänge werden durch Taurochenodeoxycholat gehemmt (K_i = 26 µM im Ileum; 9 µM in der Leber). Das pH-Optimum ist in Ileumzellen viel weniger ausgeprägt als in Leberzellen. Andererseits sind die Einflüsse der Na^+-Konzentration und von Hemmern wie Ouabain und Antimycin A in beiden Zelltypen sehr ähnlich. Neuere Untersuchungen aus unserem Labor zeigten, daß der Taurocholat-Carrier in Meerschweinchenleberzellen dem der Ratte sehr ähnlich ist (Locher, 1983). Die Carrier von Darm und Leber scheinen sich also hinsichtlich ihrer Substratbindungseigenschaften zu unterscheiden, während sie bezüglich ihrer energetischen Kopplung sehr ähnlich sind.

Im Gegensatz zu den hydrophilen Gallensäuren Taurocholat und Cholat, werden die hydrophoben Gallensäuren Chenodeoxycholat und Lithocholat von den Zellen so schnell aufgenommen, daß eine zeitliche Auflösung der Aufnahmegeschwin-

digkeit nicht möglich ist. Da ihre Aufnahme in Zellen von Ileum und Jejunum gleich ist und nicht auf Änderungen der Na^+-Konzentration, Gallensäurekonzentration, zellulären Energieversorgung oder Temperatur anspricht, kann man annehmen, daß die Aufnahme dieser Gallensäuren vorwiegend durch passive Diffusion erfolgt, in Übereinstimmung mit den Befunden von De Witt und Lack (78).

4.2.2. Cholin

Cholin wird häufig zu den Vitaminen gezählt, weil die meisten Tierarten es in kleinen Mengen in der Nahrung zu sich führen müssen (79). Cholin ist eine quartärnäre Ammoniumbase und daher stets positiv geladen. Diese Ladung sollte seine Resorption verhindern, wenn es nicht spezifische Transportsysteme in der Darmmukosa gäbe. Diese Systeme wurden an Präparaten von Hühnchen (80), Ratte (81), Hamster (81), Kaninchen (82) und Meerschweinchen (79) untersucht. In allen Präparaten wurde Cholin in einem sättigbaren Prozeß aufgenommen und die ermittelten K_m-Werte lagen zwischen 83 µM und 600 µM. Insofern sind diese Ergebnisse einheitlich. Die Frage aber, ob der Transport Na^+- und energieabhängig ist, wird von den Arbeiten widersprüchlich beantwortet. Deswegen habe ich diese Frage erneut aufgegriffen. Meine Ergebnisse zeigen, daß der Transport energieabhängig ist und die Versuche mit Ouabain und K^+-Medium sprechen für einen sekundär aktiven Transport, wie beim Riboflavin und Taurocholat. Wie dabei das positiv geladene Cholin durch den Na^+-Gradienten in seinem Membrandurchtritt gefördert wird, dafür gibt es bisher kein Modell. Die Ergebnisse unterscheiden sich von früheren Resultaten mit isolierten Darmsegmenten des Meerschweinchens, wo nur eine äußerst geringe Na^+-abhängigkeit und keine Energie-abhängigkeit nachweisbar war. Dabei ist aber zu beachten, daß beim Darmsegment keine echten Anfangsgeschwindigkeiten gemessen wurden und die Ergebnisse durch zusätzliche Barrieren in der Darmwand moduliert werden.

Auch der viel höhere K_m-Wert, der im Darmsegment gefunden wurde, läßt sich durch Besonderheiten dieses Präparates klären: Die ungerührten Schichten an der Mukosaoberfläche führen nämlich zu einer künstlichen Erhöhung des K_m-Wertes (83).

4.2.3. Riboflavin

Die Lokalisation der Riboflavinabsorption war bisher unklar (84,85,86). Der hier vorgelegte Vergleich zwischen Zellen aus Jejunum und Ileum zeigt eindeutig, daß beide Zelltypen in der Lage sind, Riboflavin zu transportieren.

Die starke Temperaturabhängigkeit schließt eine Diffusion als Transportmechanismus aus (87) und weist darauf hin, daß es sich um einen spezifischen Transport handelt. Die Sättigbarkeit spricht für die Beteiligung eines Carriers. Der scheinbare K_m-Wert (70 - 87 nM), der hier bestimmt wurde, ist niedriger, als die Werte, die früher in perfundierten Darmsegmenten der Ratte ermittelt wurden (3 µM oder 0,54 µM) (88,89) oder der Wert, der aus Darmsäcken ermittelt wurde (1 µM) (90). Die höheren K_m-Werte der anderen Untersuchungen könnten auf den ungerührten Schichten beruhen, die beim Experimentieren mit ganzen Darmwänden auftreten und zu einer künstlichen Erhöhung der K_m-Werte führen (83).

Die Radioaktivität von Riboflavin wurde in den Darmzellen 7-fach konzentriert. Dies weist darauf hin, daß das Molekül bergauf transportiert wird und dementsprechend eine treibende Kraft für die Aufnahme benötigt; die Experimente mit Antimycin A bestätigen, daß die Aufnahme ein energieabhängiger Prozeß ist.

Wenn der transmembranöse Na^+-Gradient verringert wurde, (entweder durch Hemmung der Na^+-Pumpe mit Ouabain oder durch Inkubation in Na^+-freiem Medium), so wurde die Riboflavinaufnahme gehemmt. Demnach dürfte die Aufnahme über einen sekundär aktiven Mechanismus durch den Na^+-Gradienten angetrieben werden. In diesem Falle wäre die früher in perfundierten Darmsegmenten gefundene Na^+-Abhängigkeit (88,89) nicht eine Folge veränderter transmuraler H_2O-Flüsse wie Rivier meinte, sondern beruht auf einem Ribo-

flavin-Na^+-Cotransport.

Der Mechanismus der Riboflavinaufnahme ähnelt dem der viel besser untersuchten Glukose (91). Beide Verbindungen werden sowohl durch Organpräparate, als auch durch isolierte Darmzellen in sättigbaren, Na^+-abhängigen Vorgängen transportiert. Entsprechend den unterschiedlichen physiologischen Erfordernissen ist die Kapazität des intestinalen Riboflavintransportes (V_{max} = 1,6 - 1,8 pMol/mg Prot. x Min.) sehr viel kleiner, als die für Zucker (V_{max} = 10000 pMol/mg Prot. x Min.) (12). Andererseits ist die Affinität von Riboflavin zu seinem Carrier einige tausend mal höher, als die Affinität von Zuckern zum Na^+-abhängigen Zucker-Carrier (12), so daß auch kleinste Spuren von Riboflavin in vivo noch gut resorbiert werden können. Wenn allerdings unter experimentellen Bedingungen große Mengen von Riboflavin verabreicht werden, so wird der Carrier gesättigt und die Diffusion wird als Transportmechanismus wichtiger (89).

Da Riboflavin von allen Teilen des Dünndarms transportiert wird, sollte eine lokalisierte Malabsorption, die bei Darmerkrankungen vorkommen kann, die Gesamtresorption des Vitamins kaum beeinträchtigen. Dies dürfte ein Grund dafür sein, daß Riboflavin-Mangelerscheinungen nur selten beobachtet werden.

Tab.1 zeigt vergleichend die kinetischen Konstanten der untersuchten Transportvorgänge.

Konstante	Taurocholat	Cholat	Cholin	Riboflavin
Km (uM)	231	240	119	0,07
Vmax pMol/mg/min	7	3,3	0,2	0,002

Tab. 1

4.3. BEDEUTUNG DER KONJUGATION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IM DARM

Es ist schon lange bekannt, daß natürliche Östrogene im Darm mit Glukuronsäure konjugiert werden. Viel wichtiger aber ist die Beobachtung, daß auch synthetisierte Östrogene, die als Kontrazeptiva Anwendung finden, von der Mukosa glukuronidiert werden können (31). Kürzlich wurde gezeigt, daß bei der Ratte mehr als 50 % einer intrajejunal verabreichten Dosis von Äthinylöstradiol während der Resorption mit Glukuronsäure (und etwas Sulfat) konjugiert wird (92). Dieser first pass effect könnte die Bioverfügbarkeit beeinflussen. Deswegen muß die intestinale Konjugation näher untersucht werden, da ja Ernährung und Darmerkrankungen, (die besonders in den Tropen häufig sind) einen Einfluß darauf haben könnten. Die hier vorgenommenen Versuche mit Äthinylöstradiol zeigten, daß sich isolierte Zellen für derartige Untersuchungen sehr gut eignen werden.

Da solche Studien kaum apparative Voraussetzungen erfordern, können sie auch in Ländern der Dritten Welt durchgeführt werden, wo eine zuverlässige Kontrazeption heute noch wichtiger ist, als in Mitteleuropa.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für Untersuchungen der spezifischen Transportvorgänge im Darm werden Präparate benötigt, welche die intrazellulären Substratkonzentrationen aufdecken. Ich entwickelte eine Methode zur Isolierung von Darmmukosazellen aus Meerschweinchen, die für solche Transportstudien geeignet sind. Die Zellen wurden morphologisch geprüft und biochemisch getestet und erfüllten alle Kriterien für vitale Zellen.

Die hydrophilen Gallensäuren Taurocholat und Cholat wurden nur in Zellen des Ileum, nicht aber in Zellen des Jejunums aufgenommen. Der Transport war sättigbar, Na^+-abhängig und energieabhängig und führt zu einer 90-fachen (Taurocholat) intrazellulären Akkumulation. Demgegenüber wurden die lipophilen Gallensäuren Lithocholat und Chenodeoxycholat in Zellen aus allen Darmabschnitten schnell aufgenommen.

Die wasserlöslichen Vitamine Riboflavin und Cholin wurden in Zellen aller Darmabschnitte aufgenommen. Der Transport beider Substanzen war sättigbar, energie- und Na^+-abhängig und führt zu einer 7-fachen (Riboflavin) beziehungsweise 110-fachen (Cholin) intrazellulären Akkumulation.

Äthinylöstradiol ist ein stark lipophiles synthetisches Östrogen. Es wurde schnell in Zellen aller Darmabschnitte aufgenommen und intrazellulär in wasserlösliche Konjugate umgewandelt, die die Zellen verließen.

Diese Versuche zeigen, daß Darmmukosazellen Transportproteine besitzen, welche die Aufnahme physiologisch wichtiger hydrophiler Moleküle regulieren. Diese Zellen bieten ein gutes Modell für Untersuchungen von Transport und Metabolismus der Mukosa. Vorversuche zeigten, daß mit diesen Methoden auch menschliche Mukosazellen isoliert und untersucht werden können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1 Proteous,J.W.:
The isolation of brush borders (microvilli) from the epithelial cells of mammalian small intestine. Subcellular components: Preparation and fractionation, 2nd edn. (ed. G.D. Birnie), 157 - 183. London: Butterworth; Blatimore: University pork press (1972).

2 Proteous,J.W.:
The regulation of glucose metabolism during its oxygen dependant translocation through the columnar absorptive cells of rat jejunum.
Intestinal permeation (workshop conference Hoechst) (ed. M. Kramer & F. Lauterbach), 240 - 261. Amsterdam Excerpta Medica (1977)

3 Prichard,P.J. & Proteous,J.W.:
Steady-state metabolism and transport of D-glucose by rat small intestine.
Biochem. J. 164, 1 - 14 (1977)

4 Gangl,A. & Ockner,R.K.:
Intestinal metabolism of plasma free fatty acids.
J. Clin. Invest. 55, 803 - 813 (1975)

5 Hülsman,W.C.:
Preferential oxidation of fatty acids by rat small intestine.
FEBS Letters, Amsterdam 17, 35 - 38 (1971)

6 Windmueller,H.G. & Spaeth,A.E.:
Fat transport and lymph plasma protein biosynthesis by isolated intestine.
J. Lipid Res. 13, 92 - 105 (1972)

7 Windmueller,H.G. & Spaeth,A.E.:
Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine.
J. biol. chem. 249, 5070 - 5079 (1974)

8 Windmueller,H.G. & Spaeth,A.E.:
Metabolism of absorbed asparatate, asparagine, and arginine by rat small intestine in vivo.
Archs. Biochem. Biophys. 175, 670 - 676 (1976)

9 Lamers,J.M.J. & Hülsmann,W.C.:
Pasteur effect in the in vitro vascularly perfused rat small intestine.
Biochim. Biophys. Acta 275, 491 - 495 (1972)

10 Parsons,D.S. & Volman-Mitchell,H.:
The transmission of glutamate and asparatate during absorption in vitro by small intestine of chicken, guinea-pig and rat.
J. Physiol. Lond. 239, 677 - 694 (1974)

11 Hanson,P.J. & Parsons,D.S.:
The utilisation of glucose and production of lactates by in vitro preparation of rat small intestine: effects of vascular perfusion.
J. physiol., Lond. 255, 775 - 795

12 Kimmich,G.A.:
Preparation and properties of mucosal epithelial cells isolated from small intestine of the chicken.
Biochemistry 9, 3659 - 3668 (1970)

13 Harrer,D.S., Stern,B.K. & Reilly,R.W.:
Removal and dissociation of epithelial cells from the rodent gastro-intestinal tract.
Nature, 203, 319 - 320 (1964)

14 Huag,K.C.:
Uptake of L-Tyrosine and 3-0 methylglucose by isolated intestinal epithelial cells.
Life Sci. 4, 1201 - 1206 (1965)

15 Stern,B.K., Reilly,R.W.:
Some characteristics of the respiratory metabolism of suspensions of rat intestinal epithelial cells.
Nature 205, 563 - 565 (1965)

16 Hartmann,F., Owen,R. & Bissel,D.M.:
Characterisation of isolated epithelial cells from the rat small intestine.
Am. J. Physiol. 242, G 147 - 155 (1982)

17 Stern,B.K. & Jensen,W.E.:
Active transport of glucose by suspensions of isolated rat intestinal epithelial cells.
Nature 209, 789 - 790 (1966)

18 Evans,E.M., Wrigglesworth,J.M., Burdett,K. & Pover,W.F.R.:
Studies on epithelial cells isolated from guinea pig small intestine.
J. Cell Biol. 51, 452 - 464 (1971)

19 Towler,C.M., Pugh-Humphreys,G.P. & Proteous,J.W.:
Characterisation of columnar absorptive epithelial cells isolated from rat jejunum.
J. Cell Sci. 29, 53 - 75 (1978)

20 Harrison,D.D. & Webster,H.L.:
The preparation of isolated intestinal crypt cells.
Exp. Cell Res. 55, 257 - 260 (1969)

21 Sjöstrand,F.S.:
A simple and rapid method to prepare dispersions of columnar epithelial cells from the rat intestine.
Ultrastructure Res. 22, 424 - 442 (1968)

22 Grafström,R., Moldeus,P., Andersson,B. & Orrenius,S.:
Xenobiotic metabolism by isolated rat small intestinal cells.
Medical Biology 57, 287 - 293 (1979)

23 George,D.P.:
Junctions between cells. In cell membranes.
(editors, Weissmann,G. & Claiborne,R.) pp. 87 - 94
HP Publishing Co., Inc. Publishers. New York, N.Y. (1975)

24 Weiser,M.M.:
Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis.
J. Biol. Chem. 248, 2536 - 2541 (1973)

25 Evans,E.M., Wrigglesworth,J.M., Burdett,K. & Pover, W.F.R.:
Studies on epithelial cells isolated from guinea pig small intestine.
J. Cell Biol. 51, 452 - 464 (1971)

26 Schwarz,L.R., Burr,R., Schwenk,M., Pfaff,E. & Greim,H.:
Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells.
Eur. J. Biochem. 55, 617 - 623 (1975)

27 Alpers,D.H. & Isselbacher,K.J.:
Fatty liver: Biochemical and clinical aspects.
In: Diseases of the liver (editor, Schiff,L.)
pp. 815 - 832 (1975)

28 Rose,R.C.:
Water soluble vitamin absorption in intestine.
Ann. Rev. Physiol. 42, 157 - 171 (1980)

29 Longcope,C. & Williams,K.I.H.:
The metabolism of synthetic estrogens in non-users and users of oral contraceptives.
Steroids 25, 121 - 133 (1975)

30 Bolt,H.:
Metabolism of oestrogens- Natural and synthetic.
Pharmacol. Ther. 4, 155 - 181 (1979)

31 Melli,A., Gargill,D.I., Giannina,T. & Steinetz,B.G.:
Studies on the transport of oestrogens by the rat small intestine in vivo.
Proc. Soc. Biol. Exp. Med. 129, 937 - 944 (1968)

32 Reed,M.J. & Fotherby,K.:
Intestinal absorption of synthetic steroids.
J. Steroid Biochem. 11, 1107 - 1112 (1979)

33 Back,D.J., Bates,M.W., Breckenridge,A.M., Francesca,E., Grawford,F.E., Orme,M.L., Rowe,P.H., Smiles,G. & Smith,E.:
Ethinylestradiol and norethindrone metabolism by everted sacs of rat ileum.
Contraception 18, 127 - 135 (1978)

34 Barber,H.E., Dawod,S.H. & Hawkworth,G.M.:
Intestinal metabolism during transport of ethinylestradiol across the rat small intestine in vitro.
Br. J. Clin. Pharmacol. 8, 410 (1979)

35 Back,D.J., Bates,M.W., Breckenridge,A.M., Ellis,A., Hall,J.M., Maciver,M., Orme,M.L., Rowe,P.H.:
The in vitro metabolism of ethinylestradiol, mestranol and levenorgestrel by human jejunal mucosa.
Br. J. Clin. Pharmacol. 11, 275 - 278 (1981)

36 Schwenk,M., Schiemenz,C., Lopez del Pino,V. & Remmer,H.:
First pass biotransformation of ethinylestradiol in rat small intestine in situ.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321, 223 - 225 (1982)

37 Baur,H., Kasparek,S. & Pfaff,E.:
Criteria of viability of isolated liver cells.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 827 - 838 (1975)

38 Bergmeyer,H.U. & Bernt,E.:
LDH: UV-assay with pyruvate and NADH.
In: Bergmeyer (ed.): Methoden der enzymatischen Analyse. pp. 607 - 612 Verlag Chemie. Weinheim (1974)

39 Schwenk,M. & Schwarz,L.R.:
Preincubation accelerates taurocholate uptake by isolated liver cells.
Biochim. Biophys. Acta 646, 344 - 347 (1981)

40 Schwenk,M.:
Transport systems of isolated hepatocytes.
Arch. Toxicol. 44, 113 - 126 (1980)

41 Estabrook,R.W.:
Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios.
Methods Enzymol. 10, 41 - 47 (1967)

42 Szarkowska,L. & Klingenberg,M.:
On the role of ubiquinone in mitochondria.
Biochem. Z. 338, 674 - 697 (1963)

43 Dixon,M.:
The determination of enzyme inhibitor constants.
Bioch. J. 55, 170 - 171 (1953)

44 Christopher,M., Towler,G.P., Pugh,H. & John,W.P.:
Characterisation of columnar absorptive epithelial cells isolated from rat jejunum.
J. Cell Sci. 29, 53 - 75 (1978)

45 Lawrence,M.P.:
Separation and use of enterocytes.
Methods in Enzymology 77, 154 - 163 (1981)

46 Gaginella,T.S., Hadda,A.C., Go,V.L.W. & Philipps,S.F.:
Cytotoxicity of ricinoleic acid (Castor oil) and other intestinal secretagogues in isolated intestinal epithelial cells.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 201, 259 - 266 (1976)

47 Watford,M., Lund,P. & Krebs,H.A.:
Isolation and metabolic characteristics of rat and chicken enterocytes.
Biochem. J. 178, 589 - 596 (1979)

48 Bihler,I. & Cypulsky,R.:
Sugar transport at the basal and lateral aspect of the small intestinal cell.
Biochim. Biophys. Acta 298, 429 - 437 (1973)

49 Pothier,P. & Hugon,J.S.:
Characterization of isolated villus and crypt cells from the small intestine of the adult mouse.
Cell Tissue Res. 211, 405 - 418 (1980)

50 Dawson,J.R. & Bridges,J.W.:
Intact guinea pig intestinal cells as a model for studying drug metabolism.
Biochem. Soc. Trans. 7, 1106 - 1107 (1979)

51 Mian,N. & Pover,W.F.R.:
Loss of cellular material from suspensions of isolated epithelial cells of guinea pig small intestine.
Biomedic. 20, 186 - 191 (1974)

52 Gall,D.G., Butter,D.G., Teppermann,F. & Hamilton,J.R.:
Sodium ion transport in isolated intestinal epithelial cells.
Biochim. Biophys. Acta, 339, 291 - 302 (1974)

53 Iemhoff,W.G.J., van den Berg,J.W.O., de Pijper,A.M. & Hülsmann,W.C.:
Metabolic aspects of isolated cells from rat small intestinal epithelium.
Biochim. Biophys. Acta 215, 229 - 241 (1970)

54 Hoffmann,A.G.D. & Kuksis,A.:
Improved isolation of villus and crypt cells from rat small intestinal mucosa.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 57, 832 - 842 (1979)

55 O'Doherty,P.J.A. & Kuksis,A.:
Glycerolipid biosynthesis in isolated rat intestinal epithelial cells.
Can. J. Biochem. 53, 1010 - 1019 (1975)

56 Pfaff,E., Schuler,B., Krell,H. & Höke,H.:
Viability control and special properties of isolated rat hepatocytes.
Arch. Toxicol. 44, 3 - 21 (1980)

57 Hülsmann,W.C., van den Berg,J.W.O. & de Jonge,H.R.:
Isolation of intestinal mucosa cells.
Meth. Enzymol. 32 B, 665 - 673 (1974)

58 Mian,N., Anderson,C.E. & Kent,P.W.:
Effect of sulfated glycopeptides on kinetics of 3-O-methyl glucose and 2-deoxyglucose transport by epithelial cells isolated from rabbit small intestine.
Eur. J. Biochem. 97, 197 - 204 (1979)

59 Wilson,F.A. & Treanor,L.L.:
Characterization of the passive and active transport mechanism for bile acid uptake into rat isolated intestinal epithelial cells.
Biochim. Biophys. Acta 406, 280 - 293 (1975)

60 Schwenk,M., Burr,R. & Pfaff,E.:
Influence of viability on bromosulfophthalein uptake by isolated hepatocytes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 295, 99 - 102 (1976)

61 Orrenius,S., Thor,H., Rojs,J. Berggren,M.:
Isolated rat hepatocytes as an experimental tool in the study of cell injury. Effect of anoxia.
Forensic Sci. 8, 255 - 263 (1976)

62 Playoust,M.R., Lack,L. & Weiner,I.M.:
Effect of intestinal resection on bile salt absorption in dogs.
Am. J. Physiol. 208, 363 - 369 (1965)

63 Krag,E. & Phillips,S.F.:
Active and passive bile acid absorption in man.
Perfusion studies of the ileum and jejunum.
J. Clin. Invest. 53, 1686 - 1694 (1974)

64 Lack,L. & Weiner,I.M.:
In vitro absorption of bile salts by small intestine of rats and guinea pigs.
Am. J. Physiol. 200, 313 - 317 (1961)

65 Holt,P.R.:
Intestinal absorption of bile salts in the rat.
Am. J. Physiol. 207, 1 - 7 (1964)

66 Lücke,H., Stange,G., Kinne,R. & Murer,H.:
Taurocholate-sodium co-transport by brush-border membrane vesicles isolated from rat ileum.
Biochem. J. 174, 951 - 958 (1978)

67 Schiff,E.R., Small,N.C. & Dietschy,J.M.:
Characterization of the kinetics of the passive and active transport mechanisms for bile acid absorption in the small intestine and colon of the rat.
J. Clin. Invest. 51, 1351 - 1362 (1972)

68 Dietschy,J.M., Salomon,H.S. & Siperstein,M.S.:
Bile acid metabolism. I. Studies on the mechanisms of intestinal transport.
J. Clin. Invest. 45, 832 - 846 (1966)

69 Little,J.M. & Lester,R.:
Autogenesis of intestinal bile salt absorption in the neonatal rat.
Am. J. Physiol. 239, 319 - 323 (1980)

70 Wilson,F.A. & Treanor,L.L.:
Studies of relationships among bile-acid uptake, Na^+-K^+-ATPase and Na^+-gradient in isolated cells from rat ileum.
Gastroenterology 81, 54 - 60 (1981)

71 Wilson,F.A. & Dietschy,J.M.:
Characterization of bile acid absorption across the unstirred water layer and brush border of the rat jejunum.
J. Clin. Invest. 51, 3015 - 3025 (1972)

72 Lack,L. & Weiner,I.M.:
Intestinal bile salt transport: structur-activity relationships and other properties.
Am. J. Physiol. 210, 1142 - 1152 (1966)

73 Lack,L., Walker,J. & Hsu,C.H.:
Taurocholateuptake by membrane vesicles prepared from ileal brush borders.
Life Sci. 20, 1607 - 1612 (1977)

74 Rouse,D.J. & Lack,L.:
The requirements for taurocholate transport by ileal brush border membrane vesicles.
Life Sci. 25, 45 - 52 (1979)

75 Wilson,F.A. & Treanor,L.L.:
Glycodeoxycholate transport in brush border membrane vesicles isolated from rat jejunum and ileum.
Biochem. Biophys. Acta 554, 430 - 440 (1979)

76 Beesley,R.C. & Faust,R.G.:
Sodium ion-coupled uptake of taurocholate by intestinal brush-border membrane vesicles.
Biochem. J. 178, 299 - 303 (1979)

77 Schwarz,L.R., Burr,R., Schwenk,M., Pfaff,E. & Greim,H.:
Uptake of taurocholic acid by isolated liver cells.
Eur. J. Biochem. 64, 189 - 197 (1976)

78 De Witt,E.H. & Lack,L.:
Effects of sulfation patterns on intestinal transport of bile salt sulphate esters.
Am. J. Physiol. 238, G 34 - 39 (1980)

79 Kuczler,F.J., Nahrwold,D.L. & Rose,R.C.:
Choline influx across the brush border of guinea-pig jejunum.
Biochem. et Biophys. Acta, 465, 131 - 137 (1977)

80 Herzberg,G.R. & Lerner,J.:
Intestinal absorption of choline in the chick.
Biochem. Biophys. Acta, 307, 234 - 242 (1973)

81 Sanford,P.A., Smyth,D.H.:
Intestinal transfer of cholin in rat and hamster.
J. Physiol. London 215, 769 - 788 (1971)

82 Kessler,M., Acuto,O., Storelli,C., Murer,H., Müller,M. & Semenza,G.:
A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems.
Biochem. Biophys. Acta, 506, 136 - 154 (1978)

83 Winne,D.:
Unstirred layer, source of raised Michaelis constant in membrane transport.
Biochem. Biophys. Acta 298, 27 - 31 (1973)

84 Christensen,S.:
The biological fate of riboflavin in mammals.
Acta Pharmacol. Toxicol. 32 (Suppl.), 1 - 72 (1973)

85 Chen,C. & Yamauchi,K.:
Histochemical study on riboflavin.
J. Vitaminol. 7, 163 - 181 (1961)

86 Middleton,E.J. & Grice,H.C.:
Vitamine absorption studies IV. site of absorption of ^{14}C-riboflavin and ^{35}S-thiamine in the rat.
Can. J. Biochem. 42, 353 - 358 (1964)

87 Schwarz,L.R., Burr,R., Schwenk,M., Pfaff,E. & Greim,H.:
Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells.
Eur. J. Biochem. 55, 617 (1975)

88 Rivier,D.A.:
Kinetics and Na^+-dependence of riboflavin absorption by intestine in vivo.
Experientia 29, 1443 - 1446 (1973)

89 Daniel,H., Wille,U. & Rehner,G.:
In vitro kinetics of the intestinal transport of riboflavin in rats.
J. Nutr. 113, 636 - 643 (1983)

90 Meinen,M., Aeppli,R. & Rehner,G.:
Studies on the absorption of thiamine, riboflavin and pyridoxine in vitro.
Nutr. Metab. 21 (Suppl. 1), 264 - 266 (1977)

91 Kimmich,G.A., Carter-Su,C. & Randles,J.:
Energetics of Na^+-dependent sugar transport by isolated intestinal cells: evidence for a major role for membrane potentials.
Am. J. Physiol. 233, E357 - E362 (1977)

92 Schwenk,M., Schiemenz,C., Lopez del Pino,V. & Remmer,H.:
First pass biotransformation of ethinylestradiol in rat small intestine in situ.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321, 223 - 225 (1982)

LEBENSLAUF

- Am 1. 6. 1949 wurde ich, Esmail Ebrahim Mohamed Hegazy, als Sohn der Eheleute Zaineb und Ebrahim Hegazy in Belbis, Sharkia, Ägypten, geboren.
- Von 1955 – 1967 verbrachte ich meine Grundschul- und Gymnasialzeit in Belbis, Ägypten.
- Im Oktober 1967 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Kairo in Ägypten.
- Im Dezember 1973 bestand ich das medizinische Staatsexamen.
- Von Februar 1974 bis Februar 1975 arbeitete ich als "Houseofficer" in der Universitätsklinik in Kairo.
- Von März 1975 bis November 1975 arbeitete ich als "resident" im Hliopolis-Krankenhaus in Kairo.
- Von Dezember 1975 bis Januar 1977 absolvierte ich meinen Militärdienst.
- Ab Februar 1977 bis März 1979 arbeitete ich in der Medizinischen Biochemie-Abteilung der Universität Al Azhar, Ägypten.
- Im April 1979 bekam ich ein Stipendium vom DAAD, um meine medizinische Doktorarbeit in Deutschland anzufertigen.
- Von April 1979 bis Oktober 1979 besuchte ich das Goethe-Institut in Blaubeuren, um Deutschkenntnisse zu erlangen.
- Im Oktober 1979 begann ich meine Doktorarbeit im Institut für Toxikologie der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Dr. h. c. H. Remmer.
- Ab April 1983 bis 30. Juni 1983 nahm ich an einem Kursus für Tropenmedizin und Medizinische Parasitologie im Bernhard-Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten in Hamburg teil.
- Die Abschlußprüfung habe ich am 29. Juni 1983 mit Erfolg bestanden.
- Seit 1. 9. 1976 bin ich mit Frau Mervat, geb. Hassan, Studentin der Wirtschaftsfakultät, Kairo, verheiratet.
- August 1980 Geburt unserer ersten Tochter, im April 1982 kam unsere zweite Tochter zur Welt.